



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/575, 14/495, 16/18, A61K 38/17</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/01316</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Januar 1996 (18.01.96)</p>		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02552</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juni 1995 (30.06.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>P 44 23 190.3 1. Juli 1994 (01.07.94)</div> <div>DE</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>195 11 243.1 27. März 1995 (27.03.95)</div> <div>DE</div> </div> </p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-PHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖTTEN, Gertrud [DE/DE]; Weihwiesenweg 17, D-69245 Bammental (DE). NEID-HARDT, Helge [DE/DE]; Birkenweg 7, D-35041 Marburg (DE). BECHTOLD, Rolf [DE/DE]; Carl-Zuckmayer-Strasse 21, D-69126 Heidelberg (DE). POHL, Jens [DE/DE]; Kellerswiesen 3, D-76707 Hambrücken (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> </td> </tr> </table>			<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02552</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juni 1995 (30.06.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>P 44 23 190.3 1. Juli 1994 (01.07.94)</div> <div>DE</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>195 11 243.1 27. März 1995 (27.03.95)</div> <div>DE</div> </div> </p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-PHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖTTEN, Gertrud [DE/DE]; Weihwiesenweg 17, D-69245 Bammental (DE). NEID-HARDT, Helge [DE/DE]; Birkenweg 7, D-35041 Marburg (DE). BECHTOLD, Rolf [DE/DE]; Carl-Zuckmayer-Strasse 21, D-69126 Heidelberg (DE). POHL, Jens [DE/DE]; Kellerswiesen 3, D-76707 Hambrücken (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02552</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juni 1995 (30.06.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>P 44 23 190.3 1. Juli 1994 (01.07.94)</div> <div>DE</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>195 11 243.1 27. März 1995 (27.03.95)</div> <div>DE</div> </div> </p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-PHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKA MBH [DE/DE]; Czernyring 22, D-69115 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖTTEN, Gertrud [DE/DE]; Weihwiesenweg 17, D-69245 Bammental (DE). NEID-HARDT, Helge [DE/DE]; Birkenweg 7, D-35041 Marburg (DE). BECHTOLD, Rolf [DE/DE]; Carl-Zuckmayer-Strasse 21, D-69126 Heidelberg (DE). POHL, Jens [DE/DE]; Kellerswiesen 3, D-76707 Hambrücken (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			
<p>(54) Title: NOVEL GROWTH OR DIFFERENTIATION FACTOR OF THE TGF-β FAMILY</p> <p>(54) Bezeichnung: NEUER WACHSTUMS-/DIFFERENZIERUNGSFAKTOR DER TGF-β-FAMILIE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a protein of the TGF-β family, the DNA which codes for it and a pharmaceutical composition containing such a protein.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Protein der TGF-β-Familie, die dafür codierende DNA und eine ein solches Protein enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung.</p>				

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

- 1 -

Neuer Wachstums-/Differenzierungsfaktor der TGF- β -Familie

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen neuen Wachstums-/Differenzierungsfaktor der TGF- β -Familie und dafür codierende DNA-Sequenzen.

Zu der TGF- β -Familie von Wachstumsfaktoren gehören die BMP-, TGF- und Aktivin/Inhibin-verwandten Proteine (Roberts und Sporn, Handbook of Experimental Pharmacology 95, 419-472 (1990)). Sie sind für einen weiten Bereich medizinischer Behandlungsmethoden und Anwendungen relevant. Diese Faktoren eignen sich in Verfahren, welche die Wundheilung und die Gewebewiederherstellung betreffen. Weiterhin induzieren mehrere Mitglieder der TGF- β Familie das Gewebewachstum, wie zum Beispiel das Wachstum von Knochen.

Wozney (Progress in Growth Factor Research 1 (1989), 267-280) und Vale et al. (Handbuch of Experimental Pharmacology 95 (1990), 211-248) beschreiben verschiedene Wachstumsfaktoren, wie etwa diejenigen, die mit der BMP- und der Aktivin/Inhibin-Gruppe verwandt sind. Die Mitglieder dieser Gruppe weisen signifikante strukturelle Ähnlichkeiten auf. Der Vorläufer des Proteins besteht aus einer aminoterminalen Signalsequenz, einer Propeptid- und einer carboxyterminalen Sequenz von 110 bis 140 Aminosäuren, die vom Vorläufer abgespalten wird und das reife Protein darstellt. Weiterhin sind ihre Mitglieder durch eine Aminosäuresequenzhomologie definiert. Das reife Protein enthält die am höchsten konservierten Sequenzen, insbesondere sieben Cysteinreste, die unter den Familiemitgliedern konserviert sind. Die TGF- β -artigen Proteine sind multifunktionelle, hormonell aktive Wachstumsfaktoren. Sie weisen auch verwandte biologische Aktivitäten, wie etwa chemotaktische Attraktion von Zellen, Förderung der Zelldifferenzierung und Gewebe-induzie-

- 2 -

rende Fähigkeiten auf. EP 0 222 491 A1 offenbart Sequenzen von Inhibin alpha und beta Ketten.

Insgesamt zeigen die Proteine der TGF- β -Familie Unterschiede in ihrer Struktur, was zu erheblichen Variationen in ihrer genauen biologischen Funktion führt. Weiterhin werden sie in einem weiten Bereich unterschiedlicher Gewebearten und Entwicklungsstufen gefunden. Folglich können sie Unterschiede hinsichtlich ihrer genauen Funktion, z.B. der erforderlichen zellulären physiologischen Umgebung, ihrer Lebensdauer, ihrer Zielorte, ihrer Erfordernisse für Hilfsfaktoren und ihrer Beständigkeit gegen Abbau aufweisen. Obwohl zahlreiche Proteine, die ein Gewebe-induktives Potential zeigen, beschrieben werden, müssen ihre natürlichen Aufgaben im Organismus und -noch bedeutsamer- ihre medizinische Relevanz noch im Detail erforscht werden. Das Vorhandensein von noch unbekannten Mitgliedern der TGF- β -Familie, die für die Differenzierung/Induktion von verschiedenen Gewebearten bedeutsam sind, wird mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen. Eine große Schwierigkeit bei der Isolierung dieser neuen TGF- β -artigen Proteine besteht jedoch darin, daß ihre Funktionen noch nicht genau genug für die Entwicklung eines unterscheidungskräftigen Bioassays beschrieben werden können. Andererseits ist die erwartete Nukleotidsequenzhomologie zu bekannten Mitgliedern der Familie zu gering, um ein Screening durch klassische Nukleinsäurehybridisierungstechniken zu ermöglichen. Dennoch ist die weitere Isolation und Charakterisierung von neuen TGF- β -artigen Proteinen dringend erforderlich, um weitere Induzierungs- und Differenzierungsproteine bereitzustellen, die alle gewünschten medizinischen Erfordernisse erfüllen. Diese Faktoren könnten medizinische Anwendung bei der Heilung von Schäden und der Behandlung von degenerativen Erkrankungen von verschiedenen Geweben finden.

In der Patentanmeldung PCT/EP93/00350 ist eine Nukleotid- und Aminosäuresequenz für das TGF- β -Protein MP121 angegeben, wobei ein Großteil der dem reifen Peptid entsprechenden Sequenz

- 3 -

angegeben ist. Die vollständige Sequenz des Propeptids MP121 wird nicht offenbart.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, DNA Sequenzen bereitzustellen, die für neue Mitglieder der TGF- β -Proteinfamilie mit mitogenem und/oder Differenzierungs-induktivem Potential codieren. Insbesondere besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, die vollständige DNA- und Aminosäuresequenz des TGF-Proteins MP121 bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein DNA-Molekül, das für ein Protein der TGF- β -Familie codiert und

- (a) den für das reife Protein codierenden Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz,
 - (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz,
 - (c) eine einem allelischen Derivat einer der Sequenzen aus (a) und (b) entsprechende Nukleotidsequenz, oder
 - (d) eine von der Sequenz (a) aufgrund ihrer Herkunft aus anderen Wirbeltieren abweichende Sequenz,
 - (e) eine mit einer der Sequenzen aus (a), (b), (c) oder (d) hybridisierende Sequenz umfaßt
- unter der Voraussetzung, daß ein DNA-Molekül gemäß (e) zumindest den für ein reifes Protein der TGF- β -Familie codierenden Anteil enthält.

Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung betreffen den Gegenstand der Ansprüche 2 bis 10. Andere Merkmale und Vorteile der Erfindung gehen aus der Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen hervor. Die Sequenzprotokolle und Zeichnungen werden jetzt kurz beschrieben.

SEQ ID NO.1 zeigt die vollständige Nukleotidsequenz der für das humane TGF- β -Protein MP121 codierenden DNA. Das ATG-Startcodon

- 4 -

beginnt mit Nukleotid 128. Der Start des vollständigen reifen Proteins beginnt besonders bevorzugt mit Nukleotid 836.

SEQ ID NO.2 zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des Präproteins des humanen TGF- β -Proteins MP121, die aus der in SEQ ID NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz abgeleitet wurde. Der Beginn des reifen Proteins liegt vorzugsweise im Bereich der Aminosäuren 217-240, besonders bevorzugt bei Aminosäure 236 oder 237, am meisten bevorzugt bei Aminosäure 237.

SEQ ID NO.3 zeigt die vollständige Nukleotidsequenz der für das TGF- β -Protein MP121 aus Maus codierenden DNA. Der codierende Bereich beginnt am ATG-Startcodon mit Nukleotid 131 und endet am Stoppcodon beginnend mit der Position 1187. Der Start des bevorzugten reifen Proteins beginnt mit Nukleotid 839. In der genomischen DNA befindet sich zwischen Position 446 und 447 ein ca. 5,5 kb großes Intron.

SEQ ID NO.4 zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des Präproteins des TGF- β -Proteins MP121 aus Maus, die aus der in SEQ ID NO.3 gezeigten Nukleotidsequenz abgeleitet wurde. Der Beginn des reifen Proteins liegt in Analogie zum humanen MP121 in SEQ ID NO.2 im Bereich der Aminosäuren 217-240. Am meisten bevorzugt beginnt das reife Protein bei Aminosäure 237, so daß der reife Anteil wie beim humanen MP121 aus 116 Aminosäuren besteht. Mitglieder der TGF- β -Familie werden zur Abtrennung des muren Anteils vom precursor häufig hinter einer RXXR Spaltstelle geschnitten (siehe Özkaynak et al., J.Biol.Chem. 267, 25220-25227 (1992) und die darin zitierte Literatur). Im Falle von MP121 aus Maus ist deshalb auch ein Beginn des reifen Proteins zumindest zum Teil mit der Aminosäure 236 denkbar.

SEQ ID NO.5 zeigt die Nukleotidsequenz des humanen MP121 Gens an den Exon/Intron-Übergängen. Die Nukleotide aus beiden Exons sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet, die des Introns durch Kleinbuchstaben.

- 5 -

Figur 1 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz von humanem MP121 mit einigen Mitgliedern der TGF- β -Familie (Inhibin α - und β -Ketten) mit Beginn am ersten der sieben konservierten Cysteinreste. * bedeutet, daß die Aminosäure in allen verglichenen Proteinen gleich ist; + bedeutet, daß die Aminosäure in mindestens einem der Proteine im Vergleich zu humanem MP121 übereinstimmt.

Figur 2 zeigt die Nukleotidsequenzen der Oligonukleotidprimer, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wurden und einen Vergleich dieser Sequenzen mit bekannten Mitgliedern der TGF- β -Familie. M bedeutet A oder C, S bedeutet C oder G, R bedeutet A oder G und K bedeutet G oder T. 2a zeigt die Sequenz des Primers OD, 2b zeigt die Sequenz des Primers OID.

Figur 3 zeigt einen schematisierten Western blot mit Hühner-Antikörpern gegen humanen MP121.

Figur 4 zeigt die Expression von MP121 im Vergleich zu Aktivin β_A und β_B in verschiedenen Mausgeweben.

Figur 5 zeigt einen positiven Einfluß auf das Überleben von dopaminergen Neuronen durch Behandlung mit teilgereinigtem MP121.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff "reifes Protein" darüber hinaus aber auch funktionelle Teilbereiche des Gesamtproteins, die im wesentlichen gleiche biologische Aktivität aufweisen und vorzugsweise solche Teilbereiche, die mindestens den Bereich der sieben in der TGF- β -Familie konservierten Cysteine umfassen. Insbesondere ist es hierbei möglich, daß der N-Terminus der reifen Proteine leicht modifiziert ist, also von den in SEQ ID NO.2 und 4 gezeigten Sequenzen abweicht. Es können hier sowohl zusätzliche Aminosäuren, die die Funktionalität des Proteins nicht beeinflussen, vorhanden sein als auch Aminosäuren fehlen, soweit auch in diesem Fall die Funktionalität nicht einge-

- 6 -

schränkt ist. Bevorzugt ist jedoch, daß das humane und das Maus-Protein alle Aminosäuren ab Aminosäure 237 der in SEQ ID NO.2 und SEQ ID NO.4 gezeigten Aminosäuresequenz enthält. Von anderen Familienmitgliedern der TGF- β -Familie ist bereits bekannt, daß das Anhängen zusätzlicher Aminosäuren an den N-Terminus des reifen Proteins die Aktivität nicht beeinträchtigt, wobei u.a. 6 zusätzliche Histidine am N-Terminus angehängt wurden.

Die vorliegende Erfindung umfaßt also den für das reife Protein gemäß obiger Definition codierenden Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz sowie Sequenzen, die dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechen und allelische Derivate solcher Sequenzen. Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch DNA-Sequenzen, die für ein Protein der TGF- β -Familie codieren, welche erhalten wurden aus anderen Säugern und welche eine in geringem Umfang aufgrund ihrer Herkunft abweichende Sequenz aufweisen, jedoch für Proteine mit prinzipiell gleicher biologischer Funktion und ebenfalls nur gering abweichender Sequenz codieren. Solche Sequenzen weisen sehr große Übereinstimmungen miteinander auf, wie aus einem Vergleich der SEQ ID NO.1 und NO.3 zu entnehmen ist.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch mit derartigen Sequenzen hybridisierende Sequenzen unter der Voraussetzung, daß ein solches DNA-Molekül zumindest den für ein reifes Protein der TGF- β -Familie (gemäß der obigen Definition) codierenden Anteil vollständig enthält und die biologische Aktivität erhalten bleibt.

Der Begriff "funktioneller Anteil" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet einen Proteinanteil, der in der Lage ist, z.B. als Signalpeptid-, Propeptid- bzw. reifer Proteinanteil zu wirken, d.h. mindestens eine der biologischen Funktionen der natürlichen Anteile von MP121 erfüllen.

- 7 -

Der für den reifen Anteil des Proteins codierende Bereich reicht im Fall des bevorzugten humanen MP121 vorzugsweise von Nukleotid 836 bis zum Stoppcodon, welches bei Nukleotid 1184 der in der SEQ ID No.1 gezeigten Sequenz beginnt. Gegebenenfalls kann das DNA-Molekül noch weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Sequenz umfassen, nämlich die für den Signal oder/und Propeptidanteil codierenden Nukleotidsequenzen. Besonders bevorzugt umfaßt das DNA-Molekül die Sequenz für den Signal- und Propeptidanteil und den Anteil des reifen Proteins, d.h. die Nukleotide 128 bis 1184 der in SEQ ID NO.1 gezeigten Sequenz. Im Fall des bevorzugten Maus-MP121 reicht der für den reifen Anteil des Proteins codierende Bereich vorzugsweise von Nukleotid 839 bis zum Stoppcodon beginnend mit der Position 1187, der in SEQ ID NO.3 gezeigten Sequenz. Gegebenenfalls kann das DNA-Molekül auch noch weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.3 gezeigten Sequenz umfassen, nämlich ggf. Signal- oder/und Propeptidanteil codierende Nukleotidsequenzen.

Andererseits können die DNA-Moleküle neben dem für das reife Protein codierenden Anteil auch noch funktionelle Signal- oder/und Propeptidanteile von anderen Proteinen, z.B. von Proteinen mit Cystine Knot Motif (Cell, Vol. 73 (1993), S. 421-424) und insbesondere von anderen Proteinen der TGF- β -Familie, z.B. den oben genannten Aktivin/Inhibin- oder BMP-Proteinen, insbesondere auch MP52 (siehe PCT/EP94/02630) umfassen. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen sind aus den oben genannten Referenzen zu entnehmen, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Wichtig ist hierbei, daß der richtige Leserahmen für das reife Protein erhalten bleibt. Je nachdem, in welchen Wirtszellen die Expression stattfindet, könnte das Vorhandensein einer anderen Signalsequenz oder/und eines anderen Propeptidanteils die Expression positiv beeinflussen. Der Austausch von Propeptidanteilen durch entsprechende Anteile anderer Proteine ist z.B. bei Mol. Endocrinol. 5 (1991), 149-155 und Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 2905-2909 beschrieben.

- 8 -

Obwohl die allelischen, degenerierten, aus anderen Wirbeltieren stammenden und hybridisierenden Sequenzen, die von der vorliegenden Erfindung umfaßt werden, strukturelle Unterschiede aufgrund geringfügiger Änderungen in der Nukleotid- oder/und Aminosäuresequenz aufweisen, besitzen die von derartigen Sequenzen codierten Proteine noch im wesentlichen die gleichen nützlichen Eigenschaften, die ihren Einsatz in grundsätzlich den gleichen medizinischen Anwendungen ermöglichen.

Gemäß vorliegender Erfindung bedeutet die Bezeichnung "Hybridisierung" übliche Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise Bedingungen mit einer Salzkonzentration von 6 x SSC bei 62 bis 66°C, gefolgt von einem einstündigen Waschen mit 0,6 x SSC, 0,1 % SDS bei 62 bis 66°C.

Bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind DNA-Sequenzen, wie oben definiert, die aus Wirbeltieren, vorzugsweise Säugern, wie etwa Schweinen, Kühen und Nagern, wie etwa Ratten oder Mäusen, und insbesondere von Primaten, wie etwa Menschen, erhältlich sind bzw. entsprechenden Sequenzen nachgebildet sind.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die in SEQ ID NO. 1 und 3 gezeigten und als humanes bzw. Maus-MP121 bezeichneten Sequenzen. Die Transkripte von MP121 wurden aus Leber-Gewebe erhalten und codieren für ein Protein, das eine beträchtliche Aminosäurehomologie zum reifen Teil der Inhibin/Aktivin-artigen Proteine zeigt (siehe Figur 1). Die Proteinsequenzen von humanem α -Inhibin, Inhibin β_A (Aktivin β_A) und Inhibin β_B (Aktivin β_B) sind bei Mason et al. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 135, 957-964 (1986)) beschrieben. Einige typische Sequenzhomologien, die für bekannte Inhibin-Sequenzen spezifisch sind, wurden auch im Propeptidteil von MP121 gefunden, während andere Teile des Propeptids von MP121 erhebliche Unterschiede zu Inhibin-Propeptiden zeigen.

- 9 -

Nach bisherigen Erkenntnissen unterscheiden sich aber die Expressionsmuster von MP121 und den Aktivinen. Während Aktivine hauptsächlich in den Gonaden exprimiert werden (Aktivin β_A in Ovarien und Aktivin β_B in Hoden und Ovarien), wird MP121 hauptsächlich in der Leber exprimiert. Die Sensitivität in den bisherigen Versuchen ist jedoch noch nicht ausreichend, um eine auch geringe Expression nachzuweisen. So ist für die Aktivine in der Literatur bspw. beschrieben, daß auch außerhalb der Gonaden Expression in verschiedenen Rattengeweben sowohl in adulten Tieren (Meunier et al., Proc.Natl. Acad.Sci.USA 85, 247-251 (1988)) als auch während der Embryonalentwicklung (Roberts et al., Endocrinology 128, 3122-3129 (1991)) nachweisbar ist. Es ist daher auch für MP121 möglich, daß eine Expression in anderen Geweben noch festgestellt wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls enthält. In einem derartigen Vektor ist die erfindungsgemäße DNA-Sequenz vorzugsweise operativ mit einer Expressionskontrollsequenz verknüpft. Solche Vektoren eignen sich zur Herstellung von TGF- β -artigen Proteinen in stabil- oder transient-transformierten Zellen. Verschiedene Tier-, Pflanzen-, Pilz- und Bakteriensysteme können zur Transformation und die anschließende Kultivierung verwendet werden. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Vektoren für die Replikation in der Wirtszelle notwendige Sequenzen und sind autonom replizierbar. Weiterhin ist die Verwendung von Vektoren bevorzugt, die selektierbare Markergene enthalten, wodurch die Transformation einer Wirtszelle nachweisbar ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einer erfindungsgemäßen DNA oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Beispiele von geeigneten Wirtszellen umfassen verschiedene eukaryontische und prokaryontische Zellen wie, etwa E.coli, Insektenzellen, Pflanzenzellen, Säugerzellen und Pilze, wie etwa Hefe.

- 10 -

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein der TGF- β -Familie, das von einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 codiert wird. Vorzugsweise weist das erfindungsgemäße Protein die in SEQ ID NO.2 oder SEQ ID NO.4 gezeigte Aminosäuresequenz oder gegebenenfalls funktionelle Anteile davon (wie oben definiert) auf und zeigt biologische Eigenschaften, wie etwa Gewebe-induktive Fähigkeiten, die möglicherweise für eine therapeutische Anwendung relevant sind. Die oben genannten Merkmale des Proteins können abhängig von der Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren mit anderen Proteinen mit Cystine Knot Motif und insbesondere TGF- β -Proteinen variieren. Solche Strukturen können sich ebenfalls für klinische Anwendungen geeignet erweisen und bilden daher ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Anmeldung. Bevorzugte Heterodimere schließen Heterodimere aus einem Monomer des erfindungsgemäßen Proteins und Monomeren der α -, β A- oder β B-Inhibin-Ketten ein. Die sich aus der Heterodimerbildung ergebenden Eigenschaften können mehr in Richtung der Eigenschaften von Aktivin bzw. Inhibinen verschoben sein. Wenn z.B. ein Heterodimer mit Inhibin α -Proteinen bzw. mit anderen Inhibin β -Proteinen gebildet wird, wird davon ausgegangen, daß das MP 121/Inhibin (α -Kette)- bzw. MP 121/Aktivin (β A oder β B-Kette)-Heterodimer die Herstellung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) inhibieren bzw. aktivieren könnte. MP 121/Aktivin Heterodimere könnten auch z.B. Einfluß auf die Mesoderm-Entwicklung nehmen. Es kann weiterhin erwartet werden, daß heterodimere Formen mit einem Mitglied der BMP-Gruppe der TGF- β -Proteine dazu führen, daß BMP-ähnliche Aktivitäten verstärkt werden, wie z.B. die Fähigkeit, die Knochenbildung, Knorpelbildung oder Bildung von Bindegewebe zu induzieren bzw. zu fördern.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher heterodimere Proteine eines erfindungsgemäßen Proteins der TGF- β -Familie, das von einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 codiert wird, mit einem Monomer eines Proteins mit Cystine Knot Motif, bevorzugt eines anderen Mitglieds der TGF- β -Familie. Ähnliche heterodi-

- 11 -

mere Proteine sind in der WO93/09229, EP 0 626 451 A2 und J. Biol. Chem. 265 (1990), 13198-13205 beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind chimäre Proteine, die funktionelle Derivate bzw. Anteile eines von einer erfindungsgemäßen, von einer DNA-Sequenz codierten Proteins, wie vorzugsweise in SEQ ID NO.2 bzw. SEQ ID NO.4 gezeigt, insbesondere funktionelle Anteile des reifen Proteins aufweisen und darüber hinaus Anteile eines anderen Proteins. Das andere Protein kann hierbei wiederum ein Protein mit Cystine Knot Motif sein, das vorzugsweise auch zur TGF- β -Familie gehört, wie z.B. insbesondere MP 52 (PCT/EP94/02630). Es können jedoch auch Anteile eines komplett anderen Proteins vorhanden sein, z.B. Rezeptor-bindende Domänen von Proteinen, welche dem ursprünglichen MP 121-Protein eine andere Spezifität verleihen.

Die biologischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Proteine, vorzugsweise MP121, können z.B. in Assays gemäß Wrana et al. (Cell 71, 1003-1014 (1992)), Ling et al. (Proc. Natl. Acad. of Science, 82, 7217-7221 (1985)), Takuwa et al. (Am. J. Physiol., 257, E797-E803 (1989)), Fann und Patterson (Proc. Natl. Acad. of Science, 91, 43-47 (1994)), Broxmeyer et al. (Proc. Natl. Acad. of Science, 85, 9052-9056 (1988)), Green et al. (Cell, 71, 731-739 (1992)), Partridge et al. (Endocrinology, 108, 213-219 (1981)) oder Krieglstein et al. (EMBO J.14, 736-742 (1995)) bestimmt werden.

Überlebensfördernde Effekte auf dopaminerge Neurone in vitro wurden beschrieben für Aktivin A und TGF- β 1, -2 und -3 (Krieglstein et al., EMBO J.14, 736-742 (1995) und Krieglstein et al., Neuroscience 63, 1189-1196 (1994)). Für teilgereinigtes MP121 konnte gezeigt werden, daß das Überleben dopaminerger Neurone in einer 8-Tage Kultur über den Einfluß von Kontrollüberstand hinaus gefördert wird (Figur 5).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins der TGF- β -Familie,

- 12 -

welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine mit einer erfindungsgemäßen DNA oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte Wirtszelle kultiviert und das TGF- β -Protein aus der Zelle oder/und aus dem Kulturüberstand gewinnt. Ein solches Verfahren umfaßt die Kultivierung der transformierten Wirtszelle in einem geeigneten Kulturmedium und die Reinigung des erzeugten TGF- β -artigen Proteins. Auf diese Weise ermöglicht das Verfahren die Herstellung einer ausreichenden Menge des gewünschten Proteins zum Einsatz bei der medizinischen Behandlung oder in Anwendungen unter Verwendung von Zellkulturtechniken, bei denen Wachstumsfaktoren benötigt werden. Die Wirtszelle kann ein Bakterium, wie etwa *Bacillus* oder *E. coli*, ein Pilz, wie etwa Hefe, eine Pflanzenzelle, wie etwa Tabak, Kartoffel oder *Arabidopsis* oder eine tierische Zelle, insbesondere eine Wirbeltierzelllinie, wie etwa Mo-, Cos- oder CHO-Zelllinien oder eine Insektenzelllinie sein. Unter Ausnutzung des Baculovirus Systems kann eine Expression auch in Insektenlarven erfolgen. Bei der Herstellung in Bakterien kann es vorkommen, daß das erfindungsgemäße Protein in Form von Einschußkörpern (inclusion bodies) produziert wird. Diese inclusion bodies werden dann nach an sich bekannten Methoden renaturiert und das Protein dann in einer aktiven Form erhalten (siehe z.B. Jaenicke, R. u. Rudolph, R., Protein Structure, ed. Creighton, T.E., IRL Press, Chapter 9). Zur Herstellung von heterodimeren Proteinen mit anderen Mitgliedern der TGF- β -Familie werden beide Proteinmonomere entweder in derselben Zelle oder getrennt exprimiert, wobei auch eine gemeinsame Renaturierung bei anfallenden Formen von inclusion bodies geeignet erscheint. Bei Coexpression in derselben Zelle sind insbesondere auch virale Systeme, wie z.B. das Baculoviren-System oder das Vaccinia Virus System geeignet. Die Herstellung von heterodimeren Proteinen ist prinzipiell dem Fachmann bekannt und z.B. in der WO93/09229 und der EP 0 626 451 A2 beschrieben.

Die Herstellung von chimären Proteinen mit anderen Proteinanteilen erfordert eine entsprechende Veränderung auf DNA-Ebene, die dem Fachmann geläufig ist und durch ihn durchgeführt

- 13 -

werden kann (EMBO J. 10 (1991), 2105-2110; Cell 69 (1992), 329-341; J. Neurosci. 39 (1994), 195-210).

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, die eine pharmazeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen TGF- β -artigen Proteins als Wirkstoff enthalten. Gegebenenfalls umfaßt eine solche Zusammensetzung einen pharmazeutischen akzeptablen Träger-, Hilfs-, Verdünnungs- oder Füllstoff. Eine solche pharmazeutische Zusammensetzung kann bei der Wundheilung und Gewebewiederherstellung alleine oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen, z.B. anderen Proteinen der TGF- β -Familie oder Wachstumsfaktoren, wie etwa EGF (epidermal growth factor) oder PDGF (platelet derived growth factor) verwendet werden. Ferner kann eine solche pharmazeutische Zusammensetzung bei der Krankheitsprävention verwendet werden.

Weitere Gegenstände sind pharmazeutische Zusammensetzungen, die erfindungsgemäße heterodimere Proteine oder/und chimäre Proteine enthalten.

Bevorzugt wird die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung eingesetzt zur Behandlung und Prävention von Knochen-, Knorpel-, Bindegewebs-, Haut-, Schleimhaut-, Endothel-, Epithelial-, Neuronal-, Hirn-, Renal- oder Zahnschädigungen, zur Anwendung bei Zahnimplantaten, zur Anwendung in Wundheilungs- oder Gewebewiederherstellungsprozessen, als Morphogen zum Einsatz zur Induktion von Lebergewebewachstum, Induktion der Proliferation von Vorläuferzellen oder Knochenmarkszellen, zur Beibehaltung eines Differenzierungszustandes und zur Behandlung von Fertilitätsstörungen oder zur Empfängnisverhütung. Weiterhin kann die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung eingesetzt werden bei der Behandlung von Stoffwechselerkrankungen wie z.B. Erkrankungen des Verdauungssystems oder Erkrankungen, die den Blutzuckerspiegel betreffen.

- 14 -

Eine andere mögliche klinische Anwendung des erfindungsgemäßen TGF- β -artigen Proteins ist die Verwendung als Suppressor der Immunreaktion zur Vermeidung der Abstoßung von Organtransplantaten oder ein Einsatz im Zusammenhang mit der Angiogenese. Ferner kann das erfindungsgemäße Protein zur Fertilitätssteigerung oder Empfängnisverhütung eingesetzt werden. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann auch prophylaktisch oder in der kosmetischen Chirurgie verwendet werden. Weiterhin ist die Anwendung der Zusammensetzung nicht auf Menschen beschränkt, sondern kann auch Tiere, insbesondere Haus- und Nutztiere umfassen.

Im übrigen kann bei heterodimeren Proteinen und chimären Proteinen die Einsatzmöglichkeit und Spezifität auch durch den Anteil des anderen Proteins bzw. anderen Monomers wie gewünscht variiert werden.

Generell können mit den erfindungsgemäßen Proteinen Krankheiten behandelt werden, die mit der Expression von MP 121 zusammenhängen, einerseits durch die Erhöhung der Menge bzw. der Aktivität an vorhandenem MP 121, auf der anderen Seite auch durch Unterdrückung der MP 121-Aktivität. So ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Herstellung von Antisense-Nukleinsäuren und Ribozymen, die die Translation von MP 121 hemmen. Diese Hemmung kann entweder durch Maskieren der mRNA mit einer Antisense-Nukleinsäure erfolgen oder durch Spaltung mit einem Ribozym.

Die Herstellung von Antisense-Nukleinsäuren ist bekannt (Weintraub, H.M., Scientific American 262: 40 (1990)). Die Antisense-Nukleinsäuren hybridisieren mit der entsprechenden mRNA und bilden ein doppelsträngiges Molekül, welches dann nicht mehr translatiert werden kann. Die Verwendung von Antisense-Nukleinsäuren ist z.B. aus Marcus-Sekura, C.J., Anal. Biochem. 172 (1988), S.289-295 bekannt.

- 15 -

Ribozyme sind RNA-Moleküle, die die Fähigkeit besitzen, spezifisch andere einzelsträngige RNA-Moleküle ähnlich wie DNA-Restriktionsendonukleasen zu spalten. Die Herstellung von Ribozymen ist in Cech, J. Amer. Med. Assn. 260 (1988), S. 3030 beschrieben.

Erfindungsgemäß ist es hierbei auch möglich, geeignete Vektoren mit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz in vitro oder in vivo in Patientenzellen zu transfizieren oder die Vektoren in vitro in Zellen zu transfizieren und diese dann einem Patienten zu implantieren. Ebenso können MP 121-Antisense-Polynukleotide in Zellen eingebracht werden, die eine ungewünschte Expression von MP 121 zeigen.

Eine Unterdrückung der MP 121-Aktivität kann auch erfolgen durch Bindung von Molekülen, die im Gegensatz zu MP 121 keine Signalweiterleitung auslösen, an die MP 121-Rezeptoren.

Es sind daher im Rahmen der Erfindung auch die Rezeptoren für MP 121 an Zellen von Interesse. Zum Auffinden von Rezeptoren können zunächst verschiedene Zelllinien auf ihr Bindungsverhalten von radioaktiv markiertem MP121 (¹²⁵J-MP121) mit anschließendem cross-linking getestet werden. Von Zellen, die MP121 binden, kann nachfolgend eine cDNA-Bibliothek in einem Expressionsvektor (erhältlich bei InVitrogen) angelegt werden. Zellen, die mit Rezeptor-cDNA transfiziert wurden, können dann über die Bindung von radioaktiv markiertem MP121 selektiert werden. Dies sind dem Fachmann bekannte Methoden, wie sie z.B. für die Isolierung von Aktivin- (Mathews, L.S. & Vale, W.W., Cell 65 (1991), 973-982) und TGF- β -Rezeptoren Typ II (Lin, H. Y. et al., Cell 68 (1992), 775-785) verwendet wurden. Es ist in Analogie zu den bekannten Aktivin-Rezeptoren zu vermuten, daß es sich bei dem MP121-Rezeptor ebenfalls um einen in diese Familie gehörenden Rezeptorkomplex handelt, so daß zum Auffinden von Teilen des heteromeren Komplexes weitere dem Fachmann bekannte Methoden, wie z.B. PCR mit degenerierten Oligonukleotiden, verwendet werden können. Diese Methode ist

- 16 -

z.B. auch bei den Aktivin- und TGF- β -Rezeptoren Typ I angewendet worden (Tsuchida et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 11242-11246; Attisano et al., Cell 75 (1993), 671-680; Franzén et al., Cell 75 (1993), 681-692).

Schließlich ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Antikörper, der spezifisch an die erfindungsgemäßen Proteine binden kann, oder ein derartiges Antikörperfragment (z.B. Fab oder Fab'). Verfahren zur Herstellung eines solchen spezifischen Antikörpers oder Antikörperfragments gehören zum allgemeinen Fachwissen des Durchschnittsfachmanns. Vorzugsweise ist ein solcher Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Solche Antikörper oder Antikörperfragmente könnten sich auch für diagnostische Methoden eignen.

Weiterhin soll die Erfindung durch die folgenden Beispiele veranschaulicht werden.

Beispiel 1

Isolierung von MP121

1.1 Gesamt RNA wurde aus menschlichem Lebergewebe (40 jähriger Mann) nach der Methode von Chirgwin et al. (Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979)) isoliert. Poly (A+)-RNA wurde aus der Gesamt-RNA durch Oligo (dT)-Chromatographie gemäß den Vorschriften des Herstellers (Stratagene Poly (A) Quick-Säulen) abgetrennt.

1.2 Für die reverse Transkriptionsreaktion wurden 1 bis 2 ,5 μ g Poly (A+)-RNA für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt. Das Reaktionsgemisch enthielt 27 U RNA-Guard (Pharmacia), 2,5 μ g Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Pharmacia), 5 x Puffer (250 mmol/l Tris/HCl pH 8,5, 50 mmol/l MgCl₂, 50 mmol/l DTT, 5 mmol/l von jedem dNTP, 600 mmol/l KCl) und 20 U AMV reverse Transcriptase (Boehringer Mannheim) pro μ g Poly (A+)-RNA. Das Reaktionsgemisch (25 μ l) wurde 2 Stunden lang bei 42°C inkubiert. Der cDNA Pool wurde bei -20°C aufbewahrt.

- 17 -

1.3 Die in Figur 2 gezeigten Deoxynukleotidprimer OD und OID wurden auf einem automatischen DNA-Synthesizer (Biosearch) hergestellt. Die Reinigung erfolgte durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese und Isolierung der Hauptbande aus dem Gel durch Isotachophorese. Die Oligonukleotide wurden durch Vergleich der Nukleinsäuresequenzen von bekannten Mitgliedern der TGF- β -Familie und Auswahl von Regionen mit hoher Konservierung entworfen. Ein Vergleich dieser Region ist in Figur 2 gezeigt. Zur Erleichterung der Klonierung enthielten beide Oligonukleotide Eco RI-Schnittstellen und OD enthielt zusätzlich eine Nco I-Restriktionsschnittstelle an seinem 5'-Terminus.

1.4 Bei der PCR-Reaktion wurde 20 ng Poly (A+)-RNA entsprechende cDNA (siehe 1.2) als Ausgangsmaterial verwendet. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt und enthielt 1 x PCR-Puffer (16,6 mmol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67 mmol/l Tris/HCl pH 8,8, 2 mmol/l MgCl_2 , 6,7 μ mol/l EDTA, 10 mmol/l β -Mercaptoethanol, 170 μ g/ml Rinderserumalbumin (Gibco), 200 μ mol/l von jedem dNTP (Pharmacia), 30 pmol von jedem Oligonukleotid (OD und OID) und 1,5 U Taq-Polymerase (AmpliTag, Perkin Elmer Cetus). Das Reaktionsgemisch wurde mit Paraffin überschichtet und es wurden 40 PCR-Zyklen durchgeführt. Die Produkte der PCR-Reaktion wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und durch Ethanolpräzipitation konzentriert.

1.5 Die Hälfte der PCR-Reaktionsprodukte wurde mit den Restriktionsenzymen SphI (Pharmacia) und AlwNI (Biolabs) entsprechend den Vorschriften des Herstellers gespalten. Die zweite Hälfte wurde in einer Serie von Reaktionen mit Ava I (BRL), AlwN I (Biolabs) und Tfi I (Biolabs) geschnitten. Die Restriktionen wurden in 100 μ l mit 8 U Enzym über 2 bis 12 Stunden bei 37°C durchgeführt (außer bei Tfi I bei 65°C).

1.6 Die Produkte der Restriktionsspaltung wurden durch Agarosegelelektrophorese fraktioniert. Nach Anfärbung mit

- 18 -

Ethidiumbromid wurden nicht gespaltene Amplifikationsprodukte aus dem Gel herausgeschnitten und durch Phenolextraktion isoliert. Die erhaltene DNA wurde anschließend zweimal durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt.

1.7 Nach Ethanolpräzipitation wurde ein Viertel oder ein Fünftel der isolierten DNA reamplifiziert, wobei die gleichen Bedingungen wie für die primäre Amplifikation verwendet wurden, außer daß die Anzahl der Zyklen auf 13 verringert wurde. Die Reamplifikationsprodukte wurden gereinigt, mit den gleichen Enzymen wie oben geschnitten und die ungeschnittenen Produkte wurden, wie oben für die Amplifizierungsprodukte erläutert, aus Agarosegelen isoliert. Der Reamplifizierungsschritt wurde wiederholt.

1.8 Nach der letzten Isolierung aus dem Gel wurden die Amplifikationsprodukte durch 4 U Eco RI (Pharmacia) unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gespalten. Ein Viertel des Restriktionsgemisches wurde in den mit Eco RI gespaltenen Vektor pBluescript SK+ (Stratagene) ligiert. Nach Ligation wurden 24 Klone jeder Enzymkombination durch Sequenzieren weiteranalysiert. Der Ansatz, der mit AlwN I und Sph I geschnitten wurde, enthielt keine neuen Sequenzen, nur BMP6 und Inhibin β A Sequenzen. 19 identische neue Sequenzen, MP121 genannt, wurden in den mit Ava I, AlwN I und Tfi I geschnittenen Ansätzen gefunden. Diese Plasmide wurden pSK-MP121 (OD/OID) genannt. Eine Sequenz unterschied sich von dieser hauptsächlich gefundenen Sequenz an zwei Nukleotiden. Die Ligation und Transformation in E.coli wurde wie in Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual (1989) beschrieben durchgeführt.

Der Klon wurde zum 3'-Ende der cDNA nach der ausführlich von Frohmann (veröffentlicht von Perkin-Elmer Corp., Amplifications, 5, 11-15 (1990)) beschriebenen Methode vervollständigt. Dieselbe Leber-mRNA, welche zur Isolation des ersten MP121 Fragmentes benutzt wurde, wurde, wie oben beschrieben, revers

- 19 -

transkribiert unter Verwendung von Oligo dT (16mer) verbunden mit dem Adapterprimer (AGAATTCGCATGCCATGGTCGACGAAGC -T₁₆). Die Amplifikation wurde mit dem Adapterprimer (AGAATTCGCATGCCATGGTCGACG) und einem internen Primer (GGCTACGCCATGAACTTCTGCATA), nach der MP121 Sequenz hergestellt, durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden mit einem weiteren internen Primer (ACATAGCAGGCATGCCTGGTATTG), hergestellt nach der MP-121 Sequenz, und dem Adapterprimer reamplifiziert. Die Reamplifikationsprodukte wurden nach Restriktion mit Sph I in den ebenso geschnittenen Vektor pT7/T3 U19 (Pharmacia) kloniert und sequenziert. Die Klone wurden durch ihre Sequenzüberlappung mit dem bereits bekannten Teil der MP121-Sequenz charakterisiert. Ein Klon, genannt p121Lt 3' MP13, wurde benutzt, um ein Nco I (stumpf gemacht mit T4 Polymerase)/Sph I Fragment zu isolieren. Dieses Fragment wurde in einen der oben erwähnten pSK-MP121 (OD/OID) Vektoren kloniert, dessen OD-Primer Sequenz zum T7 Primer der pSK Multiple Cloning Site orientiert war. Dazu wurde der Vektor mit SphI und SmaI restringiert. Das Konstrukt wurde pMP121DFus6 genannt. Es beinhaltet die MP121 Sequenz von Position 922 bis 1360 wie in SEQ ID NO.1 gezeigt.

1.9 Ein Dde I Fragment von pMP121DFus6, welches von Position 931 bis 1304 in SEQ ID NO.1 reicht, wurde zum Screenen einer humanen Leber cDNA Library (Clontech, # HL3006b, Lot 36223) verwendet, wie es ausführlich bei Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, veröffentlicht von Greene Publishing Associates und Wiley-Interscience (1989)) beschrieben ist. Aus $8,1 \times 10^5$ Phagen wurden 24 Mischplaques gepickt und vereinzelt. Daraus wurden 10 Klone, die mit PCR unter Verwendung der Primer LO2 (ACATAGCAGGCATGCCTGGTATTG) und LOI1 (CTGCAGCTGTGTTGGCCTTGAGA) aus dem Dde I Fragment, ein positives Signal ergaben, ausgewählt und vereinzelt. Die cDNA wurde über eine EcoR I-Restriktion aus den Phagen isoliert und in den ebenfalls mit Eco RI gespaltenen pBluescript SK-Vektor kloniert.

- 20 -

Eine Sequenzierung eines der resultierenden Plasmide, SK121L9.1, zeigte, daß das Startcodon an Position 128 von SEQ ID NO.1 beginnt, da drei Stoppcodons in-frame vor diesem Startcodon an Position 62, 77 und 92 liegen. Der Start des reifen MP121 liegt bei Position 836 von SEQ ID NO.1, legt man die Sequenzanalogie zu anderen TGF- β Proteinen zu Grunde, was der Aminosäure 237 in SEQ NO.2 entspricht. Das Stoppcodon beginnt an Position 1184 der SEQ ID NO.1.

Das Plasmid SK121L9.1 wurde unter der Hinterlegungsnummer 9177 bei der DSM am 26.4.94 hinterlegt.

1.10 Isolation der MP121 cDNA und genomischer DNA aus Maus:
Die Sequenzinformationen aus der humanen MP121 Sequenz wurden zur Isolation der MP121 Sequenz aus der Maus genutzt. Die dazu angewendeten Methoden sind alle dem Fachmann bekannt und z.B. in Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley & Sons, 1987-1995) oder bei Molecular Cloning (Sambrook et al., second edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989) beschrieben.

Zunächst wurden die Primer ACGAATTCCGACGAGGCATCGACTGC und GCGTCGACTACCATGTCAGGTATGTC von der humanen MP121 Sequenz mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen am 5'Ende (EcoR I bzw. Sal I) synthetisiert. Diese Primer wurden auf genomischer Maus DNA zur Amplifikation eingesetzt. Das entstehende 0.35 kb Fragment wurde in den Bluescript Vektor (Stratagene) subkloniert und als radioaktive Sonde eingesetzt. Es wurde sowohl eine λ -Bank mit genomischer Maus DNA als auch eine Bank mit cDNA nach Standardmethoden gescreent. Die cDNA wurde aus RNA, die aus Mausleber isoliert war, synthetisiert und mit EcoR I/Not I-linkern versehen in λ gt10 kloniert.

Sowohl aus der genomischen als auch aus der cDNA Bank wurden MP121 Klone isoliert. Eine die gesamte codierende Sequenz enthaltende cDNA wurde in die EcoR I Schnittstelle des Vektors Bluescript SK (Stratagene) subkloniert und das resultierende Plasmid SKMP121 Maus bei der DSM am 10.05.1995 hinterlegt (DSM

- 21 -

9964). Die vollständige Sequenzierung ergab die in SEQ ID NO.3 gezeigte Sequenz. Das Startcodon beginnt an Position 131 in SEQ ID NO.3 und endet mit dem Stoppcodon beginnend an der Position 1187. Das aus der Sequenz abgeleitete Protein ist in SEQ ID NO.4 gezeigt.

Subklonierung und Analyse der MP121 enthaltenden Klone aus der genomischen Bank ergab, daß die MP121 Sequenz im Propeptidanteil ein Intron von ca. 5,5 kb enthält. Dieses Intron befindet sich zwischen den Positionen 446 und 447 in SEQ ID NO.3. Die Exon/Intron Übergänge sind in SEQ ID NO.5 gezeigt.

Beispiel 2

Expression von MP121

Die Expression von MP121 ist sowohl in eukaryontischen als auch in prokaryontischen Systemen möglich.

Für die Expression in Prokaryonten wurde nur der reife Anteil von MP121 verwendet. Nach Aufreinigung kann das in E.coli als Monomer exprimierte reife MP121 Protein dann zu einem Dimer zurückgefalten werden. Um die Aufreinigung des MP121 zu vereinfachen, können an den N-Terminus des reifen Proteins zusätzlich 6 Histidine gehängt werden, die durch Bindung an Nickelchelate-Säulen die Aufreinigung des Proteins erleichtern.

Beispielhaft wurde der reife Anteil von humanem MP121 (Aminosäure 237 bis 352 in SEQ ID NO.2) mit 13 zusätzlichen Aminosäuren einschließlich 6 Histidinen am N-Terminus (MHHHHHKLEFAM) in dem prokaryontischen Vektor pBP4 exprimiert. Dieser Vektor ist ein pBR322 Derivat mit Tetracyclinresistenz der zusätzlich den T7 Promoter aus dem pBluescript II SK Plasmid (Stratagene) enthält. Weiterhin enthält der Vektor nach dem T7-Promoter eine ribosomale Bindestelle und ein Startcodon gefolgt von 6 Codons für

- 22 -

Histidin. Hinter mehreren singulären Restriktionsschnittstellen wie Eco RI, Xho I, Sma I und Apa I für die Insertion von Inserts sowie Stopcodons in allen drei Leserahmen folgt ein Terminator (T₀). Zum Erhalt der cDNA für den reifen Anteil von MP121 wurde eine PCR mit den beiden Oligonukleotiden GAATTCGCCATGGGCATCGACTGCCAAGGAGG und CCGCTCGAGAAGCTTCAACTGCACCCACAGGC auf dem Plasmid SK121L9.1 (DSM Hinterlegungsnummer: 9177) durchgeführt. Beide Oligonukleotide enthalten an den Enden hinzugefügte Restriktionsschnittstellen (Eco RI und Nco I bzw. Xho I und Hind III). Das resultierende 377 bp Fragment wurde stumpfendig in den mit Eco RV restringierten Vektor pBluescript II SK (Stratagene) zwischenkloniert. Ein Klon mit der Orientierung des 5' Endes von MP121 zum T7-Promoter wurde mit Eco RI restringiert und das resultierende Insert (0.38 kb) in den ebenfalls mit Eco RI restringierten pBP4 Vektor kloniert. Die richtige Orientierung des Inserts beim resultierenden Plasmid pBP4MP121His wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung festgestellt. Das Plasmid pBP4MP121His wurde am 30.1.1995 bei der DSM (Hinterlegungsnummer: 9704) hinterlegt.

Die Expression von MP121 Protein kann durch gleichzeitige Bereitstellung von T7-RNA Polymerase erfolgen. Die T7-RNA Polymerase kann über verschiedene Methoden bereitgestellt werden, wie z.B. ein zweites Plasmid mit einem Gen für T7 RNA Polymerase oder durch Infektion mit Phagen, die für die T7 RNA Polymerase codieren oder aber durch spezielle Bakterienstämme, die das Gen für T7 RNA Polymerase integriert haben. Unter Verwendung des Bakterienstammes BL21(DE3)pLysS (Novagen, #69451-1) und Induktion der T7 RNA Polymerase-Expression nach Herstellerangaben mit IPTG, wird das reife MP121 Protein mit His-Tag (MP121His) in Einschlußkörpern gebildet. Das Protein zeigt in SDS-Polyacrylamid-Gelen (15%) ein apparentes Molekulargewicht von knapp 16 kD (theoretisches Molekulargewicht: 14.2 kD) wie es repräsentativ im Westernblot der Figur 3 gezeigt ist. Die mit pBP4 transformierten Bakterien als Kontrollen zeigen jeweils keine Anfärbung spezifischer Ban-

- 23 -

den. Aufgrund des His-Tag kann dieses Protein über Nickel-chelatbildende Säulen wie z.B. beschrieben in Hochuli et al. (BIO/Technology Vol. 6, 1321-1325 (1988)) gereinigt werden. Eine zusätzliche Reinigung ist möglich über eine Reversed Phase HPLC. Es wurde einer Reversed Phase Säule (Nucleosil 300-7C4 von Macherey-Nagel, Art. 715023) mit einer Flußrate von 2 ml/min und einem Acetonitrilgradienten in 0.1 % TFA von 0 bis 90% in 100 min verwendet. Unter diesen Bedingungen eluiert MP121His ab ca. 40% Acetonitril.

Der Nachweis, daß es sich um humanes MP121 Protein handelt, wurde jeweils über Western blot Analyse mit MP121 spezifischen Antikörpern geführt. Polyklonale Antikörper gegen MP121 wurden sowohl in Hühnern als auch in Kaninchen erzeugt. Zum Erhalt des Antigens für die Immunisierung wurde ein Teil des reifen Anteils von MP121 (Aminosäure 260 bis 352 in SEQ ID NO.2) mit den ersten 98 Aminosäuren der Polymerase des MS2-Bakteriophagen fusioniert und in E.coli exprimiert. Nach Isolation der Einschlußkörper wurde das Fusionsprotein (MS2-MP121) auf Polyacrylamid-Gelen separiert und nach Kupferfärbung durch Elektroelution (Tessmer, U. & Dernick, R., IBL (1990) 8-13) für die Immunisierung isoliert. Mit Antikörpern sowohl aus Hühnern als auch aus Kaninchen ist es möglich, spezifisch Expression von MP121 nachzuweisen. Für den schematisierten Western blot in Figur 3 wurden Hühner-Antikörper verwendet, die über PEG-Präzipitation (Thalley B.S. u. Carroll, S.B., BIO/Technology Vol. 8, 934-938 (1990)) und über Membrangebundenes Antigen (Fusionsprotein (MS2-MP121)) (18.17 in Sambrook et al. Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) weitergehend aufgereinigt waren. Als zweiter Antikörper wurde Anti-Chicken IgG mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (Sigma A9171) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Tropix Western-Light Protein Detection Kit (Serva #WL10RC) nach Herstellerangaben.

Um biologisch aktives Material zu erhalten, kann das in E.coli exprimierte und aufgereinigte monomere MP121 zu einem

- 24 -

dimeren MP121 zurückgefalten werden. Dies kann nach Methoden wie z.B. beschrieben von Jaenicke, R. & Rudolph, R. (Protein structure, ed. Creighton, T.E., IRL Press, chapter 9) erfolgen.

Für die Expression in eukaryontischen Zellen wurde das Vaccinia Viren Expressionssystem verwendet, wie es ausführlich und für den Fachmann nacharbeitbar in den Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley & Sons), im folgenden abgekürzt mit CP, unter Chapter 16 Unit 16.15-16.18 beschrieben ist. Das System beruht darauf, daß Fremd-DNA unter Verwendung bestimmter Vektoren durch homologe Rekombination in das Vaccinia Virus Genoms integriert werden kann. Zu diesem Zweck enthält der verwendete Vektor das TK (Thymidinkinase) Gen aus dem Vaccinia Genom. Um eine Selektion auf rekombinante Viren zu ermöglichen, enthält der Vektor weiterhin das E.coli Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase Gen (gpt) (Falkner, F.G. & Moss, B., J. of Virol. 62 (1988), 1849-1854). In diesen Vektor wurde die cDNA mit dem gesamten codierenden Bereich für MP121 kloniert.

Um die 5' und 3' nicht translatierten Bereiche aus dem ursprünglichen Plasmid SK121L9.1 (DSM, Hinterlegungsnummer: 9177) zu verkürzen und an den Enden singuläre Restriktionsschnittstellen einzufügen, waren PCR Reaktionen und Zwischenklonierungen notwendig. Alle PCR Reaktionen wurden mit dem Plasmid SK121L9.1 (DSM Hinterlegungsnummer: 9177) durchgeführt. Zur Verkürzung des 5' nicht translatierten Endes wurde der Primer CCCGGATCCGCTAGCACCATGACCTCCTCATTGCTTCTG mit einer eingefügten Bam HI und NheI Restriktionsschnittstelle in einer PCR mit einem internen Primer (CCCTGTTGTCCTCTAGAAGTG) benutzt. Das gewonnene Fragment wurde in Bluescript SK (Stratagene) zwischenkloniert, sequenziert und auf Übereinstimmung mit der in SEQ ID NO.1 gezeigten Sequenz überprüft. Für ein verkürztes 3' nicht translatiertes Ende wurde das Sph

- 25 -

I/Eco RI Fragment (0.22 kb) aus dem Plasmid pBP4MP121His verwendet.

Die beiden End-Fragmente von humanem MP121 wurden über interne Restriktionsschnitte (Xba I und Sph I) mit der fehlenden mittleren DNA Sequenz aus dem Plasmid SK121L9.1 (DSM Hinterlegungsnummer: 9177) nach Standardmethoden (Sambrook et al. Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) verbunden. Die so erhaltene verkürzte cDNA mit dem vollständigen Leserahmen für MP121 (Nukleotid 128 bis Nukleotid 1184 in SEQ ID No.1) konnte über Ausnutzung der Restriktionsschnitte Bam HI und Eco RI in den ebenso geschnittenen Vektor pBP1 kloniert werden. Das resultierende Plasmid pBP1MP121 wurde am 12.1.95 bei der DSM (Hinterlegungsnummer: 9665) hinterlegt.

Das Plasmid pBP1MP121 wurde für die Herstellung von rekombinanten Vaccinia Viren eingesetzt. Dazu wurden zu 80 % konfluente 143B Zellen (HuTk-, ATCC CRL 8303) in 35 mm Kulturschalen mit Vaccinia Wildtyp Virus in 1 ml PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln infiziert (1 Virus auf 10 Zellen). Nach Absaugen des Überstandes und Zugabe von 2 ml Kulturmedium (MEM, Gibco BRL #041-01095 mit 1:500 verdünntem Penicillin und Streptomycin Gibco BRL #043-05140) wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde anschließend entfernt und die Transformation dieser Zellen mit 100 ng pBP1MP121, 2 µg Träger DNA (Kalbs-thymus, Ultraschall behandelt, Boehringer Mannheim #104175) und 10 µl Lipofektin (Gibco BRL #18292-011) in 1 ml MEM für ca. 15 h bei 37°C erreicht. Nach Zugabe von 1 ml MEM mit 20% FCS (Sigma #F-7524) wurde für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die lysierten Zellen anschließend eingefroren.

Die gpt Selektion auf die Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase und Isolation und Amplifizierung einzelner rekombinanter Viren erfolgte im wesentlichen wie in Unit 16.17 der

- 26 -

CP beschrieben, mit dem Unterschied, daß RK13 Zellen (ATCC CCL 37) verwendet wurden.

Die Integration der MP121 cDNA in das Virus Genom wurde durch Dot blot Analyse (CP Unit 16.18) bestätigt. Ein rekombinantes Virus aus der Transfektion mit pBPMP121 sowie der Wildtyp Virus wurden für Expressionsanalysen in den Zelllinien 143B (HuTk-, ATCC CRL 8303, human) und NIH-3T3 (DSM ACC 59, swiss mouse embryo) eingesetzt. Die Zellen wurden nach den Angaben der Vertreiber kultiviert. Die konfluenten Zellen wurden mit der dreifachen Anzahl an Viren für 30 Minuten bei 37°C infiziert und anschließend das entsprechende Kulturmedium mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin (1:500, Gibco BRL #043-05140) zugefügt. Nach 6 Stunden bei 37°C wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit z.B. HBSS (Gibco BRL #14180-046) gewaschen und Produktionsmedium (MEM für HuTk- bzw. DMEM mit 4.5 g/l Glucose und NEAA (Gibco BRL #11140-035) für NIH-3T3 jeweils versetzt mit Aprotinin (Fluka #10820, 50 U/ml) und Penicillin/Streptomycin) ohne FCS zugesetzt. Nach 20 bis 22 Stunden Produktion wurde der Zellüberstand gesammelt. Die Analyse der Expression erfolgte durch Western blots nach Standardmethoden (CP Unit 10.8). Dafür wurden die Proteine aus 1 bis 3 ml Zellkulturüberstand durch Zugabe des äquivalenten Volumens an Aceton und Inkubation von mindestens einer Stunde auf Eis präzipitiert und abzentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in Auftragspuffer (7 M Harnstoff, 1 % SDS, 7 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0,01 % Bromphenolblau und gegebenenfalls 1 % β -Mercaptoethanol) erfolgte die Auftrennung in 15%igen Polyacrylamidgelen. Als Markerproteine wurde ein vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsstandard (Gibco BRL #6041-020) eingesetzt. Der Transfer auf PVDF Membran (Immobilon #IPVH00010) und das Abblocken der Membran erfolgten nach Standardmethoden.

Eine repräsentative schematisierte Zeichnung der Western blot Ergebnisse in Figur 3 zeigt, daß bei den mit rekombinanten Viren infizierten Zellen MP121 spezifische Banden auftreten.

- 27 -

Die Expression von MP121 in NIH-3T3 Zellen führt zu einem sekretierten Protein mit einem im Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen erscheinenden Molekulargewicht von ungefähr 18 kD (erwartetes theoretisches Molekulargewicht: 25 kD). Unter reduzierenden Bedingungen läuft das Protein bei ungefähr 15 kD im Gel (erwartetes theoretisches Molekulargewicht: 12.5 kD). Diese Ergebnisse zeigen, daß MP121 wie zu erwarten als dimeres reifes Protein exprimiert wird. Das relativ wenig verlangsamte Laufverhalten des dimeren MP121 Proteines gegenüber dem monomeren MP121 Protein ist wahrscheinlich mit einer globulären Struktur zu begründen. Die Prozessierung des Vorläuferproteins zum reifen Protein konnte auch in HuTK-Zellen gezeigt werden. Bei mit Wildtyp Viren (ohne integrierte Fremd-DNA) infizierten Zellen (HuTK- oder NIH-3T3) traten keine Banden im Western blot auf.

Das Vaccinia Expressionssystem eignet sich bei Kotransfektion mit rekombinanten Vaccinia Viren, die für unterschiedliche Mitglieder der TGF- β -Familie codieren, insbesondere auch für die Bildung von Heterodimeren. Über Affinitätssäulen mit spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen TGF- β -Familienmitglieder ist es dann möglich, Heterodimere von Homodimeren zu trennen. Insbesondere von Interesse sind dabei die α - sowie die β A- und β B-Ketten der Inhibine.

Beispiel 3

Untersuchung zur Expression von MP121 in verschiedenen Mausgeweben

Total RNA aus verschiedenen Geweben (Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge, Milz, Muskel, Ovar, Hoden) von 6 Wochen alten Mäusen sowie aus embryonalen Stammzellen wurde nach Standardmethoden isoliert. Jeweils 10 μ g total RNA wurden in einen RNase Protection Assay (RPA) von Ambion (RPA II Kit, #1410) nach Herstellerangaben eingesetzt. Um spezifische Proben für Aktivin β _A und Aktivin β _B zu erhalten, wurde die genomische DNA von Maus (129Sv) mit entsprechend spezifischen

- 28 -

Primern aus dem reifen Anteil der Proteine, amplifiziert. Zur Erleichterung der Klonierung wurden an den Enden der Primer jeweils EcoR I und/oder BamH I oder Hind III Restriktions-schnittstellen eingefügt. Für Aktivin β_A wurden die Primer von der mRNA aus Ratten (GenBank Accession #M37482) abgeleitet:

GGATCCGAATTCGGCTTGGAGTGTGATGGCAAGG
und GGATCCGAATTCCTCTGGGACCTGGCAACTCTAG.

Für Aktivin β_B wurden degenerierte Primer von der humanen Sequenz (Mason et al., Molecular Endocrinology 3, 1352-1358 (1989) abgeleitet:

GAGAATTCCA (GA) CA (GA) TT (TC) TT (CT) AT
und GCAAGCTTT (GA) TA (TC) TC (GA) TC (GA) TC.

Die entstehenden PCR Fragmente wurden in den Vektor pGEM-4 (Promega) subkloniert und überprüft. Die Aktivin-spezifischen und damit in RPA geschützten Sequenzen haben die Fragmentgröße von 369 bp für Aktivin β_A und 254 bp für Aktivin β_B . Bei MP121 umfaßt das geschützte Fragment die Sequenz von Position 887 bis Position 1164 in der SEQ ID NO.3. Die in pGEM-4 klonierten Fragmente wurden zur Herstellung der radioaktiv markierten antisense RNA-Proben in vitro transkribiert. Dies erfolgte nach Herstellerangaben (Promega, Riboprobe Gemini Systems) unter Verwendung von 100 μ M CTP und gleichzeitig α^{32} P-CTP (800 Ci/mmol, Amersham). Ebenso wurde als Kontrolle eine radioaktiv markierte RNA von dem mit Dde I linearisierten Plasmid pTri-GAPDH (Ambion #7431) jedoch unter Verwendung von 1 mM CTP synthetisiert. Nach Isolation der 4 antisense RNA-Proben aus Polyacrylamid-Gelen wurden diese mit der jeweiligen Gewebe RNA aus Maus (10 μ g total RNA pro Probe mit 1×10^5 cpm) in denselben Ansatz über Nacht bei 42°C inkubiert. Die Analyse erfolgte in einem denaturierenden Gel nach Standardmethoden mit anschließender Autoradiographie über 4 Tage.

Beispiel 4Teilreinigung von MP121 und Untersuchung zur Aktivität von teilgereinigtem MP121

MP121 Protein, welches durch Expression im Vaccinia System (s. Beispiel 2) gewonnen wurde, konnte über zwei Säulen teilgereinigt werden.

Für die Produktion von MP121 wurden konfluente NIH-3T3 Zellen (DSM ACC 59, Swiss mouse embryo) mit derselben Anzahl an rekombinanten Viren für 30 Minuten bei 37°C infiziert und anschließend das entsprechende Kulturmedium mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin zugefügt.

Nach 4 Stunden bei 37°C wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal gewaschen und Produktionsmedium (s. Beispiel 2) ohne FCS zugesetzt. Nach 20 bis 22 Stunden Produktion wurde der Zellüberstand gesammelt und zur Entfernung der Viren zentrifugiert (40000 x g für 30 Minuten bei 4°C) und filtriert (0,1 µm Porengröße, Millex VV, Millipore # SLVV25LS). Der Kontrollüberstand (wt) nach Infektion durch Wildtyp Vaccinia Viren wurde vergleichbar gewonnen. Die Expression von MP121 wurde über Western blot Analyse überprüft und auf 50-100 µg/l geschätzt.

Der Zellkulturüberstand mit MP121 (1,1 l) wurde mit dem Proteaseinhibitor PMSF (1 µM) versetzt, auf eine Endkonzentration von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris pH 8,0 gebracht und auf eine Phenyl-Sepharose (Fast Flow (high sub) Pharmacia #17-0973-05) Säule (5 ml Bett), equilibriert in Puffer A (1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris pH 8,0), geladen. Die beladene Säule wurde mit 15 Säulenvolumen Puffer A und 10 Säulenvolumen Puffer B (20 mM Tris pH 8,0) gewaschen und mit einem linearen Gradienten nach 100% Puffer C (20 mM Tris pH 8,0, 80% Ethylenglycol) bei einer Durchflußrate von 1 ml/min innerhalb von 50 Min eluiert (5 ml pro Fraktion). Über Western blot Analyse konnte überprüft werden, daß MP121 zwischen 50 und 80% Ethylenglycol eluiert. Aliquots dieser Fraktionen wurden in nach Herstellerangaben mit Silber gefärbten 15%igen Poly-

- 30 -

acrylamidgelen (Silver Stain-II, Daiichi #SE140000) überprüft und die MP121 enthaltenden Fraktionen gepoolt. Die vergleichbaren Fraktionen nach Reinigung des Kontrollüberstandes wurden nach Analyse in mit Silber gefärbten Gelen ebenfalls gepoolt.

Die gepoolten Fraktionen wurden weiter mit Hilfe einer Reversed Phase HPLC aufgereinigt. Dazu wurde eine C8-Säule (Aquapore RP300, Applied Biosystems, Partikelgröße: 7µm, Porengröße: 300Å) mit Puffer A (0,1% Trifluoressigsäure /Wasser) equilibriert. Nach Beladung der Säule mit den gepoolten, MP121 enthaltenden Fraktionen der Phenyl-Sepharose Säule, wurde ausgiebig mit Puffer A gewaschen. Das gebundene Protein wurde bei einer Flußrate von 0,2 ml/min mit einem linearen Gradienten von 1,5% Puffer B (90% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure) pro Minute eluiert. Fraktionen zu 600 µl wurden gesammelt und sowohl im Western blot als auch in mit Silber gefärbten Gelen analysiert. Das MP121 Protein eluiert unter den gewählten Bedingungen ungefähr ab 55% Acetonitril. Die Fraktionen mit MP121 wurden gepoolt. Das gleiche erfolgte mit den korrespondierenden Fraktionen aus der Reinigung des Kontrollüberstandes. Die Analyse im Silbergel ergab, daß MP121 noch mit anderen Proteinen verunreinigt war. Um gereinigtes MP121 zu erhalten, sind noch weitere Aufreinigungsschritte notwendig.

Denkbar sind für weitere Aufreinigungen auch andere dem Fachmann bekannte Methoden wie z.B. Gelsiebsäulen, Ionenaustauschersäulen, Affinitätssäulen oder Metallchelatsäulen.

Durch Western blot Analyse wurde abgeschätzt, daß aus 1 l Zellkulturüberstand ca. 8 µg teilgereinigtes MP121 isoliert wurden. Das teilgereinigte Protein wurde lyophilisiert bei -80°C aufbewahrt.

Zur Überprüfung des Einflusses von MP121 auf dopaminerge Neuronen wurden Neuronen vom Mittelhirnboden von 14 Tage alten Rattenembryonen (E14) nach einer Methode beschrieben bei Shimoda et al. (Brain Res.586, 319-331 (1992)) isoliert.

Die Vereinzelung und Kultivierung der Zellen erfolgte wie beschrieben bei Krieglstein et al. (Neuroscience 63, 1189-1196 (1994)). Die Zelldichte beträgt 200.000 Zellen/cm² auf Polyornithin/Laminin beschichteten Deckgläsern. Nach 24 Stunden Kultivierung und anschließend alle drei Tage wurden zwei Drittel des Mediums (500 µl) entfernt und ersetzt durch frisches Medium mit den entsprechenden Zusätzen. Das nach der Phenyl-Sepharose und Reversed Phase HPLC lyophilisierte, teilgereinigte MP121 wurde in 50% Acetonitril gelöst und dem Medium zugesetzt. Die Endkonzentration von MP121 im Medium beträgt 20 ng/ml (Endkonzentration von Acetonitril ist 0,3%). Von dem vergleichbar gereinigten Kontrollüberstand (wt) wurde eine vergleichbare Menge in 50% Acetonitril gelöst und eingesetzt. Die Mediumkontrolle enthält ebenfalls 0,3% Acetonitril. Nach acht Tagen wurden die Kulturen in 4% Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert, die Zellen mit Aceton (10 min, -20°C) permeabilisiert und mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen. Nach Behandlung mit 1% H₂O₂ in PBS, Waschen und Blocken mit Pferdeserum erfolgte eine immunocytochemische Färbung. Die Tyrosinhydroxylase (TH) ist ein limitierendes Enzym bei der Biosynthese von Dopamin und anderen Katecholaminen, so daß TH in den vorliegenden Kulturen (Noradrenalin enthaltende Zellen werden nicht isoliert) als Marker für dopaminerge Neuronen verwendet werden kann. TH wurde nachgewiesen über eine einstündige Inkubation bei 37°C mit einem Maus-monoklonalen Antikörper gegen Ratten TH (1:200 verdünnt, Boehringer Mannheim) und nachfolgender Detektion mit dem Vectastain ABC kit (Vecto Labs). Die TH-positiven Zellen wurden in einer Fläche von 0,12 cm² ausgezählt. Aus Fig.5 ist ersichtlich, daß MP121 einen positiven Einfluß auf das Überleben dopaminerger Neuronen aufweist.

Figur 5 zeigt die Anzahl der überlebenden TH-immunreaktiven dopaminergen Neuronen nach Isolation aus dem Mittelhirn von Rattenembryonen (E14) und 8 Tagen Kultivierung. Getestet wurde der Effekt von 20 ng/ml teilgereinigtem MP121 im Ver-

- 32 -

gleich zu der äquivalenten Menge teilgereinigten Kontroll-
überstandes (wt) sowie unbehandelte Neuronen (Kontrolle:
Medium mit 0,3% Acetonitril). Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM
aus einer Dreifachbestimmung.

Detaillierte Beschreibung der Figuren 3 bis 5

Figur 3: Schematisierter Western blot mit Hühner Antikörpern gegen MP121

1: E.coli Zellen transformiert mit pBP4MP121His unter reduzierenden Bedingungen (1% β -Mercaptoethanol)
2: Zellkulturüberstand von NIH-3T3 Zellen nach Infektion mit rekombinanten Viren (mit insertierter MP121 cDNA) unter reduzierenden Bedingungen (1% β -Mercaptoethanol)
3: Zellkulturüberstand von NIH-3T3 Zellen nach Infektion mit rekombinanten Viren (mit insertierter MP121 cDNA) unter nicht reduzierenden Bedingungen
M: vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker mit den angegebenen apparenten Molekulargewichten (Gibco BRL #26041-020)

Figur 4: Autoradiogramm nach Gelanalyse eines RNase Protection Assays mit speziifischen Proben gegen Aktivin β_A (β_A), Aktivin β_B (β_B), MP121 sowie zur Kontrolle gegen GAPDH.

Getestet wurde total RNA isoliert aus verschiedenen Mausgeweben (1: Gehirn, 2: Herz, 3: Niere, 4: Leber, 5: Lunge, 6: Muskel, 9: Ovar, 10: Milz, 11: Hoden), aus embryonalen Stammzellen (12: CJ7) und als Kontrolle aus Hefe (Spur 13). In Spur 14 wurde als Kontrolle keine RNA eingesetzt. Die in die Hybridisierung eingesetzten ungeschützten antisense RNA-Proben sind in Spur 8 und 15 aufgetragen und am rechten Rand mit der erwarteten Fragmentgröße in Klammern markiert. Die Banden für die geschützten Fragmente sind am linken Rand markiert. Als Marker (Spur 7) wurde pBR322 restringiert mit Msp I (Biolabs #303) und endmarkiert mit γ - 32 P-ATP (Amersham) genommen.

Figur 5 zeigt die Anzahl der überlebenden TH-immunreaktiven dopaminergen Neuronen nach Isolation aus dem Mittelhirn von Rattenembryonen (E14) und 8 Tagen Kul-

- 34 -

tivierung. Getestet wurde der Effekt von 20 ng/ml teilgereinigtem MP121 im Vergleich zu der äquivalenten Menge teilgereinigten Kontrollüberstandes (wt) sowie unbehandelte Neuronen (Kontrolle: Medium mit 0,3% Acetonitril). Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM aus einer Dreifachbestimmung.

- 35 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen
Entwicklung von Pharmaka mhH
- (B) STRASSE: Czernyring 22
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 69115

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neuer Wachstums-/Differenzierungs-
faktors der TGF-beta-Familie

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: WO PCT/EP95/02552

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2272 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CAAGGAGCCA TGCCAGCTGG ACACACACTT CTTCCAGGGC CTCTGGCAGC CAGGACAGAG	60
TTGAGACCAC AGCTGTTGAG ACCCTGAGCC CTGAGTCTGT ATTGCTCAAG AAGGGCCTTC	120
CCCAGCAATG ACCTCCTCAT TGCTTCTGGC CTTTCTCCTC CTGGCTCCAA CCACAGTGGC	180
CACTCCCAAGA GCTGGCGGTC AGTGTCCAGC ATGTGGGGGG CCCACCTTGG AACTGGAGAG	240
CCAGCGGGAG CTGCTTCTTG ATCTGGCCAA GAGAAGCATC TTGGACAAGC TGCACCTCAC	300
CCAGCGCCCA ACACTGAACC GCCCTGTGTC CAGAGCTGCT TTGAGGACTG CACTGCAGCA	360
CCTCCACGGG GTCCACAGG GGGCACTTCT AGAGGACAAC AGGGAACAGG AATGTGAAAT	420
CATCAGCTTT GCTGAGACAG GCCTCTCCAC CATCAACCAG ACTCGTCTTG ATTTTCACTT	480
CTCCTCTGAT AGAACTGCTG GTGACAGGGA GGTCCAGCAG GCCAGTCTCA TGTTCTTTGT	540
GCAGCTCCCT TCCAATACCA CTTGGACCTT GAAAGTGAGA GTCCTTGTGC TGGGTCCACA	600
TAATACCAAC CTCACCTTGG CTAAGTCACTA CCTGCTGGAG GTGGATGCCA GTGGCTGGCA	660
TCAACTCCCC CTAGGGCCTG AAGCTCAAGC TGCCTGCAGC CAGGGGCACC TGACCCTGGA	720

- 36 -

GCTGGTACTT GAAGGCCAGG TAGCCCAGAG CTCAGTCATC CTGGGTGGAG CTGCCCATAG 780
 GCCTTTTGTG GCAGCCCGGG TGAGAGTTGG GGGCAAACAC CAGATTCACC GACGAGGCAT 840
 CGACTGCCAA GGAGGGTCCA GGATGTGCTG TCGACAAGAG TTTTTTGTGG ACTTCCGTGA 900
 GATTGGCTGG CACGACTGGA TCATCCAGCC TGAGGGCTAC GCCATGAACT TCTGCATAGG 960
 GCAGTGCCCA CTACACATAG CAGGCATGCC TGGTATTGCT GCCTCCTTTC AACTGCGAGT 1020
 GCTCAATCTT CTCAAGGCCA ACACAGCTGC AGGCACCACT GGAGGGGGCT CATGCTGTGT 1080
 ACCCACGGCC CGGCGCCCCC TGTCTCTGCT CTATTATGAC AGGGACAGCA ACATTGTCAA 1140
 GACTGACATA CCTGACATGG TAGTAGAGGC CTGTGGGTGC AGTTAGTCTA TGTGTGGTAT 1200
 GGGCAGCCCA AGGTTGCATG GGAAAACACG CCCCTACAGA AGTGCACCTC CTTGAGAGGA 1260
 GGGAAATGACC TCATTCTCTG TCCAGAATGT GGACTCCCTC TTCCTGAGCA TCTTATGGAA 1320
 ATTACCCAC CTTTGACTTG AAGAAACCTT CATCTAAAGC AAGTCACTGT GCCATCTTCC 1380
 TGACCACTAC CCTCTTTCCT AGGGCATAGT CCATCCCGCT AGTCCATCCC GCTAGCCCCA 1440
 CTCCAGGGAC TCAGACCCAT CTCCAACCAT GAGCAATGCC ATCTGGTTCC CAGGCAAAGA 1500
 CACCCTTAGC TCACCTTTAA TAGACCCCAT AACCCACTAT GCCTTCCTGT CCTTCTACT 1560
 CAATGGTCCC CACTCCAAGA TGAGTTGACA CAACCCCTTC CCCCAATTTT TGTGGATCTC 1620
 CAGAGAGGCC CTTCTTTGGA TTCACCAAAG TTTAGATCAC TGCTGCCAA AATAGAGGCT 1680
 TACCTACCCC CCTCTTTGTT GTGAGCCCCT GTCCTTCTTA GTTGTCCAGG TGAACACTA 1740
 AAGCTCTCTT TGCATACCTT CATCCATTTT TTGTCCTTCT CTGCCTTCT CTATGCCCTT 1800
 AAGGGGTGAC TTGCCTGAGC TCTATCACCT GAGCTCCCTT GCCCTCTGGC TTCCTGCTGA 1860
 GGTCAGGGCA TTTCTTATCC CTGTTCCCTC TCTGTCTAGG TGTCATGGTT CTGTGTAAC 1920
 GTGGCTATTC TGTGTCCCTA CACTACCTGG CTACCCCTT CCATGGCCCC AGCTCTGCCT 1980
 ACATTCTGAT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGAAAAGTTA AAAATTCCTT AATTTTTTAT 2040
 TCCTGGTACC ACTACCACAA TTTACAGGGC AATATACCTG ATGTAATGAA AAGAAAAAGA 2100
 AAAAGACAAA GCTACAACAG ATAAAAGACC TCAGGAATGT ACATCTAATT GACACTACAT 2160
 TGCATTAATC AATAGCTGCA CTTTTTGCAA ACTGTGGCTA TGACAGTCCT GAACAAGAAG 2220
 GGTTCCTGT TTAAGCTGCA GTAACCTTTC TGAATATGGA TCATCGTTCC TT 2272

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 352 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- 37 -

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Thr Ser Ser Leu Leu Leu Ala Phe Leu Leu Leu Ala Pro Thr Thr
 1 5 10 15
 Val Ala Thr Pro Arg Ala Gly Gly Gln Cys Pro Ala Cys Gly Gly Pro
 20 25 30
 Thr Leu Glu Leu Glu Ser Gln Arg Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Lys
 35 40 45
 Arg Ser Ile Leu Asp Lys Leu His Leu Thr Gln Arg Pro Thr Leu Asn
 50 55 60
 Arg Pro Val Ser Arg Ala Ala Leu Arg Thr Ala Leu Gln His Leu His
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Gln Gly Ala Leu Leu Glu Asp Asn Arg Glu Gln Glu Cys
 85 90 95
 Glu Ile Ile Ser Phe Ala Glu Thr Gly Leu Ser Thr Ile Asn Gln Thr
 100 105 110
 Arg Leu Asp Phe His Phe Ser Ser Asp Arg Thr Ala Gly Asp Arg Glu
 115 120 125
 Val Gln Gln Ala Ser Leu Met Phe Phe Val Gln Leu Pro Ser Asn Thr
 130 135 140
 Thr Trp Thr Leu Lys Val Arg Val Leu Val Leu Gly Pro His Asn Thr
 145 150 155 160
 Asn Leu Thr Leu Ala Thr Gln Tyr Leu Leu Glu Val Asp Ala Ser Gly
 165 170 175
 Trp His Gln Leu Pro Leu Gly Pro Glu Ala Gln Ala Ala Cys Ser Gln
 180 185 190
 Gly His Leu Thr Leu Glu Leu Val Leu Glu Gly Gln Val Ala Gln Ser
 195 200 205
 Ser Val Ile Leu Gly Gly Ala Ala His Arg Pro Phe Val Ala Ala Arg
 210 215 220
 Val Arg Val Gly Gly Lys His Gln Ile His Arg Arg Gly Ile Asp Cys
 225 230 235 240
 Gln Gly Gly Ser Arg Met Cys Cys Arg Gln Glu Phe Phe Val Asp Phe
 245 250 255
 Arg Glu Ile Gly Trp His Asp Trp Ile Ile Gln Pro Glu Gly Tyr Ala
 260 265 270
 Met Asn Phe Cys Ile Gly Gln Cys Pro Leu His Ile Ala Gly Met Pro
 275 280 285
 Gly Ile Ala Ala Ser Phe His Thr Ala Val Leu Asn Leu Leu Lys Ala

- 38 -

290	295	300
Asn Thr Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Gly Ser Cys Cys Val Pro Thr		
305	310	315 320
Ala Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asp Ser Asn Ile		
	325 330	335
Val Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Ser		
	340 345	350

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1558 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mouse

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AAGGAGTCAT GCCAGTCGGA GGTCAATCAC ATTCCTCCCA GGGTCCCTGG TGCCCAGGAC	60
AGAGTTGAAG CACTCCCGTT GAGACCTTGA ATATAGGCTT TGGGTCCTTT AAGGAGGCTA	120
TCCTCCAGCA ATGGCCTCCT CTTTGCTCCT GGCTCTTCTG TTCCTGACTC CAACCACAGT	180
AGTGAACCCC AAAACTGAGG GTCCATGCCC AGCATGTTGG GGTGCCATCT TTGACCTGGA	240
GAGCCAGCGG GAGCTGCTTC TCGATTTGGC CAAGAAAAGT ATCCTGGACA AGCTGCACCT	300
CAGCCAGCGC CCCATACTCA GTCGGCCAGT GTCCAGAGGG GCTCTCAAGA CCGCGCTGCA	360
GCGCCTCCGC GGGCCTCGAC GGGAAACCCT GTTGGAGCAT GACCAGAGAC AAGAAGAATA	420
TGAGATCATC AGCTTTGCTG ACACAGACCT CTCCAGCATC AACCAGACCC GGCTCGAGTT	480
CCACTTCTCT GGTAGAATGG CCAGTGGCAT GGAGGTCCGG CAGACCCGCT TCATGTTCTT	540
CGTGCAAGTC CCCACAATG CCACCCAGAC CATGAATATA AGAGTTCTTG TGCTAAGACC	600
ATATGACACC AACCTCACCT TGACAAGTCA GTACGTGGTG CAGGTGAATG CCAGTGGCTG	660
GTACCAGCTT CTCCTGGGAC CTGAAGCTCA AGCTGCTTGC AGCCAGGGAC ACCTTACTCT	720
GGAGCTGGTA CCAGAAAGCC AGGTGGCCCA CAGTTCCTTG ATCCTGGGCT GGTTCCTCCA	780
CAGGCCTTTT GTGGCAGCCC AGGTAAGGGT TGAGGGCAAG CATCGGGTTC GCCGGCGAGG	840
TATCGATTGC CAGGGGGGGT CCAGGATGTG CTGTGACAA GAGTTTTTTG TAGACTTCCG	900
TGAGATTGGC TGAATGACT GGATCATCCA GCCTGAAGGC TATGCCATGA ACTTCTGCAC	960
TGGGCAGTGC CCACTACATG TGGCAGGCAT GCCTGGCATC TCTGCCTCCT TTCACACTGC	1020
AGTGCTGAAT CTGCTCAAAG CCAACGCAGC TGCTGGCACC ACTGGCAGGG GCTCGTGCTG	1080
CGTGCTTACA TCTCGGCGCC CTCTGTCTTT GCTCTACTAT GACAGGGACA GCAACATTGT	1140

- 39 -

CAAGACGGAT ATACCTGACA TGGTGGTCGA GGCCTGCGGG TGTAGTTAGC TTATGGGTGA 1200
TACAGGCTGC CTGAGGTAGA ATGGCCTTCC TCAGGAAGGG AACTCTGTT CCCACTTCTG 1260
TCCAGAATGG AAACACCTTT CTAAGCATGC AGACATCCCT CTGTGGACTT CAGGGGATCC 1320
ACCTCTAAAG AGAGTCACTA GTGACCAACA GCCTTTCTCT CTCCTGGGAC ATGTTTGACC 1380
CAGTACACCC ATCCTCAGCC TTAAGTTAGA GGCTAATCGA CTCCTACATA TATATGTCAT 1440
TTTGTCTTAG CAAACACCCC TTAGCTCCCC TTAGTCAACT ATGTAATCTA CTCTGCCTCC 1500
CTGACCCTGC CACCGGAAGG TTCCTATTCC ACGATGATAT GCCTTAGTGT CTCCCCTT 1558

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 352 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mouse

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Ser Ser Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe Leu Thr Pro Thr Thr
1 5 10 15
Val Val Asn Pro Lys Thr Glu Gly Pro Cys Pro Ala Cys Trp Gly Ala
20 25 30
Ile Phe Asp Leu Glu Ser Gln Arg Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Lys
35 40 45
Lys Ser Ile Leu Asp Lys Leu His Leu Ser Gln Arg Pro Ile Leu Ser
50 55 60
Arg Pro Val Ser Arg Gly Ala Leu Lys Thr Ala Leu Gln Arg Leu Arg
65 70 75 80
Gly Pro Arg Arg Glu Thr Leu Leu Glu His Asp Gln Arg Gln Glu Glu
85 90 95
Tyr Glu Ile Ile Ser Phe Ala Asp Thr Asp Leu Ser Ser Ile Asn Gln
100 105 110
Thr Arg Leu Glu Phe His Phe Ser Gly Arg Met Ala Ser Gly Met Glu
115 120 125
Val Arg Gln Thr Arg Phe Met Phe Phe Val Gln Phe Pro His Asn Ala
130 135 140
Thr Gln Thr Met Asn Ile Arg Val Leu Val Leu Arg Pro Tyr Asp Thr
145 150 155 160
Asn Leu Thr Leu Thr Ser Gln Tyr Val Val Gln Val Asn Ala Ser Gly
165 170 175

- 40 -

Trp Tyr Gln Leu Leu Leu Gly Pro Glu Ala Gln Ala Ala Cys Ser Gln
 180 185 190
 Gly His Leu Thr Leu Glu Leu Val Pro Glu Ser Gln Val Ala His Ser
 195 200 205
 Ser Leu Ile Leu Gly Trp Phe Ser His Arg Pro Phe Val Ala Ala Gln
 210 215 220
 Val Arg Val Glu Gly Lys His Arg Val Arg Arg Arg Gly Ile Asp Cys
 225 230 235 240
 Gln Gly Gly Ser Arg Met Cys Cys Arg Gln Glu Phe Phe Val Asp Phe
 245 250 255
 Arg Glu Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Gln Pro Glu Gly Tyr Ala
 260 265 270
 Met Asn Phe Cys Thr Gly Gln Cys Pro Leu His Val Ala Gly Met Pro
 275 280 285
 Gly Ile Ser Ala Ser Phe His Thr Ala Val Leu Asn Leu Leu Lys Ala
 290 295 300
 Asn Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Arg Gly Ser Cys Cys Val Pro Thr
 305 310 315 320
 Ser Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asp Ser Asn Ile
 325 330 335
 Val Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Ser
 340 345 350

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
 - (B) LAGE:1..3
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
 - (B) LAGE:4..18

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CAGGTAGGTC CATGGTCG

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- 41 -

- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: intron
 - (B) LAGE:1..15
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
 - (B) LAGE:16..18
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CTTGATTTTT AACAGACC

18

Patentansprüche

1. DNA-Molekül, das für ein Protein der TGF- β -Familie codiert und
 - (a) den für das reife Protein codierenden Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz,
 - (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz,
 - (c) eine einem allelischen Derivat einer der Sequenzen aus (a) und (b) entsprechende Nukleotidsequenz, oder
 - (d) eine von der Sequenz (a) aufgrund ihrer Herkunft aus anderen Wirbeltieren abweichende Sequenz,
 - (e) eine mit einer der Sequenzen aus (a), (b), (c) oder (d) hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßtunter der Voraussetzung, daß ein DNA-Molekül gemäß (d) zumindest den für ein reifes Protein der TGF- β -Familie codierenden Anteil vollständig enthält.
2. DNA-Molekül nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß es neben einem der Anteile (a) bis (e) von Anspruch 1 eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die für zumindest einen Teil eines anderen Proteins codiert und so angeordnet ist, daß sich nach Expression ein Fusionsprotein ergibt.
3. Vektor,
dadurch gekennzeichnet,
daß er mindestens eine Kopie eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1 oder 2 enthält.
4. Wirtszelle,
dadurch gekennzeichnet,

- 43 -

daß sie mit einer DNA nach Anspruch 1 oder 2 oder einem Vektor nach Anspruch 3 transformiert ist.

5. Wirtszelle nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie ein Bakterium, ein Pilz, eine pflanzliche oder eine tierische Zelle ist.
6. Protein der TGF- β -Familie, das von einer DNA Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 codiert wird.
7. Protein nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß es die in SEQ ID NO.2 oder SEQ ID NO.4 gezeigte Aminosäuresequenz oder gegebenenfalls funktionelle Anteile davon aufweist.
8. Chimäres Protein,
dadurch gekennzeichnet,
daß es ein Protein gemäß Anspruch 6 oder 7 und zumindest einen Teil eines anderen Proteins enthält.
9. Heterodimeres Protein,
dadurch gekennzeichnet,
daß es aus einem Monomer eines Proteins gemäß Anspruch 6, 7 oder 8 und einem Monomer eines anderen Proteins aus der Superfamilie mit "Cystine Knot Motif" besteht.
10. Verfahren zur Herstellung eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Wirtszelle nach Anspruch 4 oder 5 kultiviert und das Protein aus der Zelle oder/und dem Kulturüberstand gewinnt.
11. Verfahren zur Herstellung eines heterodimeren Proteins gemäß Anspruch 9,

- 44 -

dadurch gekennzeichnet,

daß man eine Coexpression beider Monomere in einer Wirtszelle durchführt.

12. Verfahren zur Herstellung eines heterodimeren Proteins gemäß Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet,

daß man eine gemeinsame Renaturierung von Einschlußkörpern beider Monomere bewirkt.

13. Pharmazeutische Zusammensetzung,

dadurch gekennzeichnet,

daß sie mindestens ein Protein nach einem der Ansprüche 6 bis 9 als Wirkstoff gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs-, Verdünnungs- oder Füllstoffen enthält.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 13 zur Behandlung oder Prävention von Knochen-, Knorpel-, Bindegewebs-, Haut-, Schleimhaut-, Endothel-, Epithelial-, Neuronal-, Hirn-, Renal- oder Zahnschädigungen, zur Anwendung bei Zahnimplantaten, zur Anwendung in Wundheilungs- oder Gewebewiederherstellungsprozessen, als Morphogen zum Einsatz zur Induktion von Lebergewebewachstum, Induktion der Proliferation von Vorläuferzellen oder Knochenmarkszellen, zur Beibehaltung eines Differenzierungszustandes und zur Behandlung von Fertilitätsstörungen oder zur Empfängnisverhütung, oder zur Behandlung von Stoffwechselerkrankungen.

15. Anti-sense RNA,

dadurch gekennzeichnet,

daß sie komplementär zu einem Teil eines DNA-Moleküls gemäß Anspruch 1 ist.

16. Ribozym,

dadurch gekennzeichnet,

- 45 -

daß es ein RNA-Molekül, das man nach Transkription eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1 erhält, spezifisch spaltet.

17. Verwendung einer Antisense-RNA gemäß Anspruch 15 oder eines Ribozyms gemäß Anspruch 16 zur Blockierung der Expression eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 6 und 7.
18. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 oder eines Vektors gemäß Anspruch 3 zur in vitro oder in vivo Transfektion von Patientenzellen.
19. Antikörper oder Antikörperfragmente,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie an ein Protein nach einem der Ansprüche 6 bis 9 binden.
20. Rezeptor,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein Protein gemäß einem der Ansprüche 6 und 7 spezifisch an ihn bindet.

1/5

Fig. 1

	10	20	30	40
MP121	CCRQEFFVDF	REIGWHDWII	QPEGYAMNFC	IGQCPLHIAG
INHIB β A	CCKKQFFVSF	KDIGWNDWII	APSGYHANYC	EGECPSHIAG
INHIB β B	CCRQQFFIDF	RLIGWNDWII	APTGYGNYC	EGSCPAYLAG
INHIB α	CHRVALNISF	QELGWERWIV	YPPSFIFHYC	HGGCGLHIP-
	++ +*+*	+*+* *+*	*++ +*	*+*****
	50	60	70	80
MP121	MPGIAASFHT	AVLNLLKANT	AAGTTGGGSC	C--VPTARRP
INHIB β A	TSGSSLSFHS	TVINHYRMRG	HSPFANLKSC	C--VPTKLRP
INHIB β B	VPGSASSFHT	AVVNQYRMRG	LNP-GTVNSC	C--IPTKLST
INHIB α	---PNLSLPV	PGAPPTPAQP	YSLPGAQPC	CAALPGTMRP
	++* +*+*	++* +	+ +*	*+*+ ++
	90	100	110	
MP121	LSLLYYDRDS	NIVKTD-IPD	MVVEACGCS	
INHIB β A	MSMLYYDDGQ	NIKKD-IQN	MIVEECGCS	
INHIB β B	MSMLYFDDEY	NIVKRD-VPN	MIVEECGCA	
INHIB α	LHVRTTSDGG	YSFKYETVPN	LLTQHCACI	
	++ +*+*	+*+* + ++	+ ++ *+*	

Fig. 2a ^{2/5}
EcoRI NcoI

OD	ATGAATTC	CCCATGGACCTGGGCTGGMAKGAMTGGAT
BMP 2		ACGTGGGGTGGGAATGACTGGAT
BMP 3		ATATTGGCTGGAGTGAATGGAT
BMP 4		ATGTGGGCTGGGAATGACTGGAT
BMP 7		ACCTGGGCTGGCAGGACTGGAT
TGF- β 1		AGGACCTCGGCTGGAAGTGGAT
TGF- β 2		GGGATCTAGGGTGGAAATGGAT
TGF- β 3		AGGATCTGGGCTGGAAGTGGGT
INHIBIN α		AGCTGGGCTGGGAACGGTGGAT
INHIBIN β_A		ACATCGGCTGGGAATGACTGGAT
INHIBIN β_B		TCATCGGCTGGGAACGACTGGAT

Fig. 2b EcoRI

OD	ATGAATTCGAGCTGCGTSGGSRACAGCA
BMP 2	GAGTTCTGTGGGACACAGCA
BMP 3	CATCTTTTCTGGTACACAGCA
BMP 4	CAGTTCAGTGGGCACACAACA
BMP 7	GAGCTGCGTGGGCGCACAGCA
TGF- β 1	CAGCGCCTGCGGCACGCAGCA
TGF- β 2	TAAATCTTGGGACACGCAGCA
TGF- β 3	CAGGTCTTGGGGCACGCAGCA
INHIBIN α	CCCTGGGAGAGCAGCACAGCA
INHIBIN β_A	CAGCTTGGTGGGCACACAGCA
INHIBIN β_B	CAGCTTGGTGGGAATGCAGCA

Fig. 3

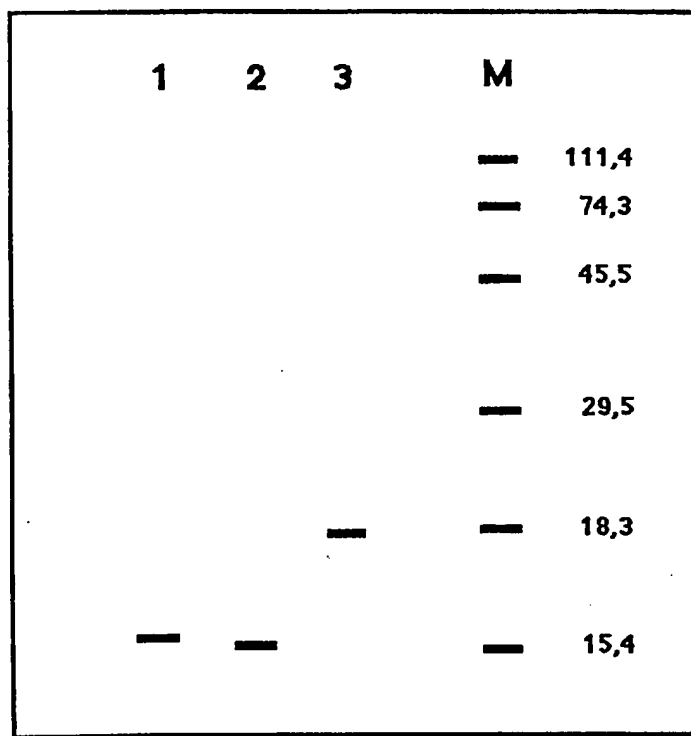
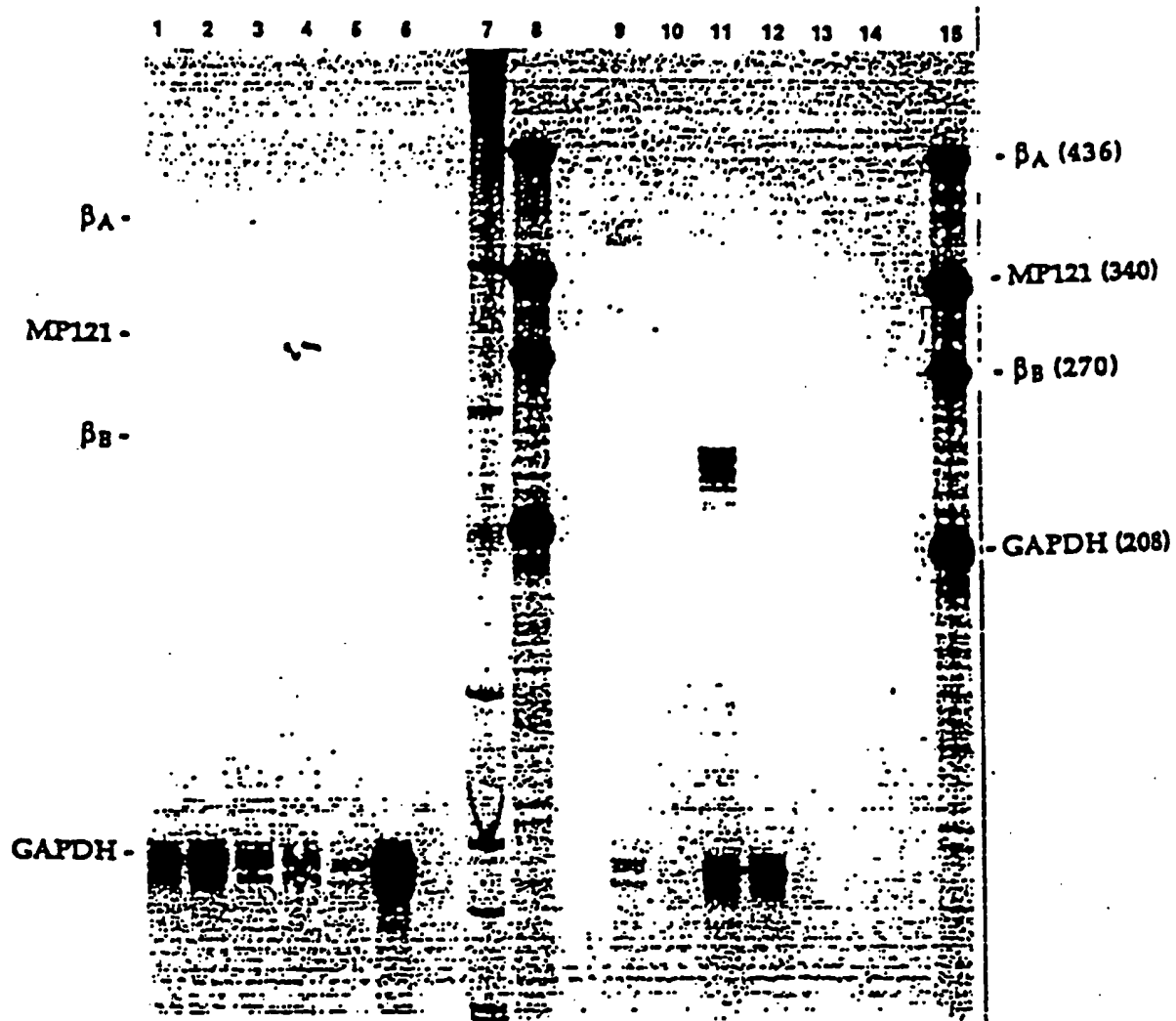
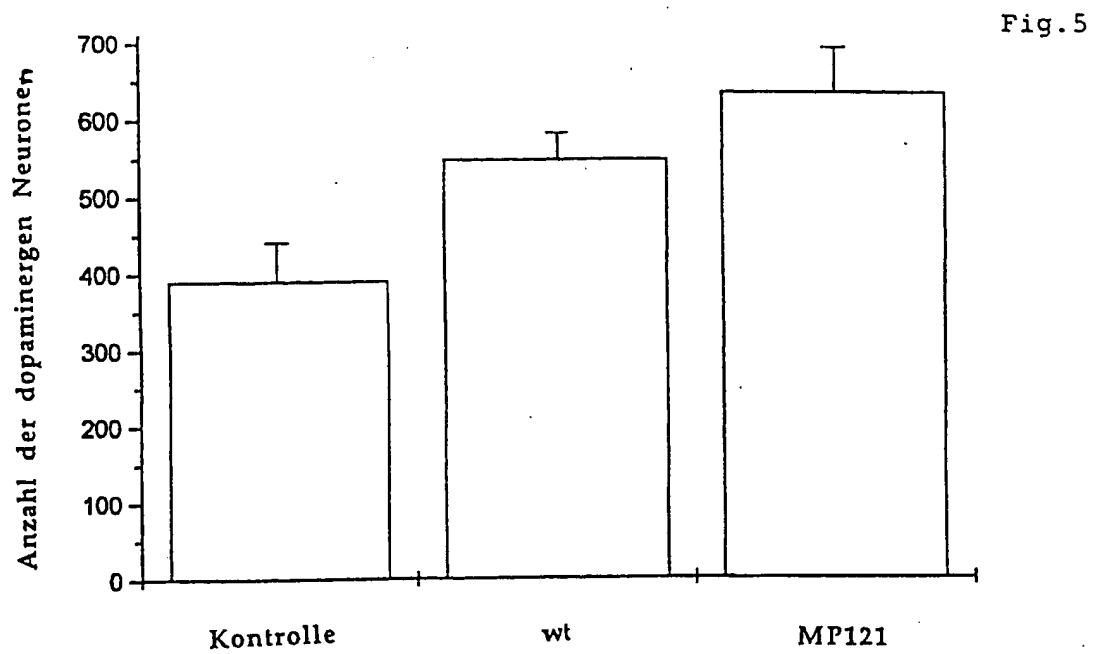


Fig. 4





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No
PCT/EP 95/02552

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/12 C07K14/575 C07K14/495 C07K16/18 A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 16099 (BIOPHARM) 19 August 1993 * Fig. 1b: MP121; Seq. Id. No 2; claims 4,13,15 *	1,7,13,14
P,X	--- BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., vol. 206, no. 2, 17 January 1995 pages 608-613, HÖTTEN, G. ET AL. 'Cloning of a new member of the TGF-beta family: A putative new activin-C chain' * whole disclosure *	1-14
A	--- EP,A,0 222 491 (GENENTECH INC.) 20 May 1987 cited in the application -----	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*&* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">13 October 1995</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">29. 11. 95</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Hermann, R</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No
PCT/EP 95/02552

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9316099	19-08-93	AU-B- 3497193	03-09-93
		CA-A- 2129820	19-08-93
		EP-A- 0625989	30-11-94
		HU-A- 67683	28-04-95
		JP-T- 7503847	27-04-95

EP-A-222491	20-05-87	US-A- 4798885	17-01-89
		AT-T- 119937	15-04-95
		AU-B- 5243393	10-03-94
		AU-B- 5465190	29-11-90
		AU-B- 603775	29-11-90
		AU-B- 6351286	09-04-87
		DE-D- 3650267	20-04-95
		DE-T- 3650267	05-10-95
		ES-T- 2072248	16-07-95
		IL-A- 80218	28-11-94
		JP-A- 63119679	24-05-88
		US-A- 5089396	18-02-92
		US-A- 5215893	01-06-93
		US-A- 5310661	10-05-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02552

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/12 C07K14/575 C07K14/495 C07K16/18 A61K38/17		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12N C07K A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,93 16099 (BIOPHARM) 19.August 1993 * Fig. 1b: MP121; Seq. Id. No 2; Ansprüche 4,13,15 *	1,7,13,14
P,X	BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., Bd. 206, Nr. 2, 17.Januar 1995 Seiten 608-613, HÖTTEN, G. ET AL. 'Cloning of a new member of the TGF-beta family: A putative new activin-C chain' * whole disclosure *	1-14
A	EP,A,0 222 491 (GENENTECH INC.) 20.Mai 1987 in der Anmeldung erwähnt	
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 13.Oktober 1995		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 29. 11. 95
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Hermann, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02552

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9316099	19-08-93	AU-B- 3497193	03-09-93
		CA-A- 2129820	19-08-93
		EP-A- 0625989	30-11-94
		HU-A- 67683	28-04-95
		JP-T- 7503847	27-04-95

EP-A-222491	20-05-87	US-A- 4798885	17-01-89
		AT-T- 119937	15-04-95
		AU-B- 5243393	10-03-94
		AU-B- 5465190	29-11-90
		AU-B- 603775	29-11-90
		AU-B- 6351286	09-04-87
		DE-D- 3650267	20-04-95
		DE-T- 3650267	05-10-95
		ES-T- 2072248	16-07-95
		IL-A- 80218	28-11-94
		JP-A- 63119679	24-05-88
		US-A- 5089396	18-02-92
		US-A- 5215893	01-06-93
		US-A- 5310661	10-05-94